



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

KOMPLEXY AMINOJÍLŮ A POLYELEKTROLYTŮ

COMPLEXES OF AMINOCCLAYS AND POLYELECTROLYTES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ivana Málková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1392/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Ivana Málková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Komplexy aminosíťů a polyelektrolitů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Prostudovat metody přípravy aminosíťů a provést rešerši na interakci aminosíťů a polymerů.
- 2) Na základě rešerše navrhnout vhodné biopolymery pro interakci s aminosíťem a příslušné metody studia dostupné v rámci FCH VUT.
- 3) Najít vhodné koncentrace aminosíťů a alespoň tří biopolymerů, kdy dojde vytvoření fázově separovaného komplexu.
- 4) Zhodnotit přípravu aminosíťů z hlediska použitého biopolymeru.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Ivana Málková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato práce se zabývá přípravou aminojílu a produktů vzniklých interakcí aminojílu s polyelektrolyty přírodního původu. Teoretická část se zabývá studiem aminojílu a vybranými polyelektrolyty, které byly použity v experimentální části práce. Za konkrétní polyelektrolyty byly zvoleny pektát draselný, alginát sodný a hyaluronan sodný. Cílem bylo nechat tyto dvě skupiny látek spolu interagovat a při zvolení vhodných koncentrací pozorovat vznik komplexu aminojíl-polyelektrolyt ve formě gelu nebo sraženiny. Vzniklé produkty byly okometricky charakterizovány a proběhlo měření pH gelů.

Abstract

This thesis deals with the preparation of aminoclay and its products resulting from the interaction of aminoclay with natural polyelectrolyte. The theoretical part deals with the study of aminoclay and selected polyelectrolytes, which were used in the experimental part of the thesis. Potassium pectate, sodium alginate and sodium hyaluronate were chosen as polyelectrolytes. The aim was to let these two groups of compounds interact and to observe the formation of an aminoclay-polyelectrolyte complex, taking form of a gel or a precipitate when appropriate concentrations were chosen. The resulting products were characterized in appearance and pH of the products was measured.

Klíčová slova

Aminojíl, polyelektrolyt, komplex aminojíl-polyelektrolyt, gel

Key words

Aminoclay, polyelectrolyte, aminoclay-polyelectrolyte complex, gel

MÁLKOVÁ, Ivana. *Komplexy aminosílu a polyelektrolytů* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113584>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové/bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Ivana Málková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D. za velký prostor a odborný dohled. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michaele Plotěné za praktické seznámení s přípravou aminosílu.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Jíly a jílové materiály	8
2.1.1	Charakteristika jílových materiálů	8
2.1.2	Fylosilikáty.....	8
2.1.3	Modifikace jílových materiálů	11
2.1.4	Synteticky připravené fylosilikáty.....	13
2.2	Aminojíl.....	13
2.2.1	Aminojíl obecně	13
2.2.2	Struktura aminojílu.....	13
2.2.3	Vlastnosti aminojílu	14
2.2.4	Syntéza aminojílu	17
2.3	Polyelektrolyty.....	17
2.3.1	Pektin.....	18
2.3.2	Alginát.....	19
2.3.3	Kyselina hyaluronová.....	21
2.4	Organo-aminojílové komplexy	23
2.4.1	Obecně.....	23
2.5	Současný stav dané problematiky.....	24
3	Experimentální část	24
3.1	Použité chemikálie.....	24
3.2	Použité přístroje	25
3.3	Příprava aminojílu	25
3.4	Vybrané látky pro tvorbu organo-aminojílových komplexů	26
3.5	Zásobní roztoky aminojílu a polyelektrolytů.....	26
3.6	Interakce aminojílu s polyelektrolyty	26
3.7	Charakterizace gelů a sraženin	27
4	Výsledky měření a diskuze	28
4.1	Interakce aminojílu s pektátem.....	28
4.1.1	Koncentrace aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	28
4.1.2	Koncentrace aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	28
4.1.3	Koncentrace aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	29

4.1.4	Koncentrace aminojílu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	29
4.2	Interakce aminojílu s alginátem.....	30
4.2.1	Koncentrace aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	30
4.2.2	Koncentrace aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	30
4.2.3	Koncentrace aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	31
4.2.4	Koncentrace aminojílu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	31
4.3	Interakce aminojílu s hyaluronanem.....	32
4.3.1	Koncentrace aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	32
4.3.2	Koncentrace aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	32
4.3.3	Koncentrace aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	33
4.3.4	Koncentrace aminojílu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	33
4.4	Měření pH.....	35
5	Závěr.....	37
6	Seznam použitých zkratk a symbolů	38
6.1	Zkratky.....	38
6.2	Symboly.....	38
7	Seznam literatury.....	39

1 ÚVOD

Aminojíly s molekulovým vzorcem $[\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3]_8\text{Si}_8\text{Mg}_6\text{O}_{16}(\text{OH})_4$ představují poměrně nový typ materiálu, který je řazen do skupiny organicky modifikovaných jíků. Jedná se o fylosilikáty obsahující ve své struktuře atomy hořčíku a na povrchu vázané 3-aminopropylové skupiny. Takto modifikované jílové minerály mají značnou chemickou a mechanickou odolnost a zároveň vykazují velmi nízkou úroveň toxicity i u velmi vysokých koncentrací ($1\,000\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Anorganická matrice aminojílu je velmi dobře mechanicky a tepelně stabilní, což dává aminojílům velký potenciál ve využití v mnoha různých aplikacích. Mezi velké výhody patří relativně snadná příprava aminojílu jednoduchou sol-gel metodou za laboratorní teploty a možnost modifikace kationtů kovů v matrici, stejně jako amino skupin, které je možné substituovat jinými organickými skupinami (hydroxylové, thiolové, fenolové aj.). Ve vodných roztocích podléhají aminoskupiny protonizaci, čímž dochází k narušení struktur a následnému vzniku disperze. Takto exfoliovaný aminojíl má tvar destiček o délce 30-50 nm a tloušťce 2-4 nm a lze na něj navázat mnoho typů biomolekul včetně léčiv, enzymů nebo polymerů [1].

Tato práce pojednává o možných interakcích hořečnatého aminojílu s vybranými polyelektrolyty, konkrétně pektátem draselným, alginátem sodným a hyaluronanem sodným, za vzniku komplexů. Cílem je pozorovat a pochopit způsob interakce těchto molekul a okometricky charakterizovat vzniklé výsledné struktury.

Polyelektrolyty jsou látky o vysoké molekulové hmotnosti. Ve své struktuře obsahují postranní skupiny, které jsou schopné elektrolyticky disociovat. Elektrolytickou disociací vzniká makroion, který v roztocích nese elektrický náboj, díky němuž je poté polyelektrolyt schopen interakcí s dalšími molekulami. V dnešní době nacházejí uplatnění v mnoha aplikacích např. v biomedicině, kosmetice, potravinářském průmyslu a využívají se také při hojení ran [2][3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Jíly a jílové materiály

Jílové materiály a jíly jsou člověkem využívány tisíce let a důkazy o využití jílu sahá až do období antiky, kdy byly využívány jako surovina pro výrobu stavebních cihel. Ve starověkém Řecku a Kypru byly tyto materiály využívány na bělení a jako mýdla pro odstranění mastnot a skvrn. Jíly byly a jsou využívány napříč celou historií lidstva a i v moderní civilizaci mají přírodní i uměle připravené a modifikované jíly velký technologický význam [4]. V dnešní době lze najít jíly téměř v čemkoli. Různé typy jílu jsou přidávány do zubních past, psacích potřeb, barev nebo je lze najít také v keramických výrobcích využívaných v domácnostech [5].

2.1.1 Charakteristika jílových materiálů

Jílové materiály jsou často ale chybně s jíly zaměňovány. Jíl je přírodní materiál obsahující kromě jílových minerálů také další horninotvorné minerály jako je živec, křemen apod. Dále mohou obsahovat také organickou hmotu. Oproti tomu jílové materiály jsou tvořeny pouze jílovými minerály. Tyto minerály mohou, ale nemusí zajišťovat některé fyzikální vlastnosti, kterých se využívá. Do jílových materiálů se řadí např. fylosilikáty, krystalické a nekrystalické modifikace SiO_2 , živce, karbonáty a různé oxidy železa nebo hliníku. Celkově jsou za jílové minerály považovány ty, jejichž částice nepřesáhne velikost $2\text{ }\mu\text{m}$ [6].

Jílové materiály se vyznačují unikátními vlastnostmi, které jsou zajištěny jejich vrstevnatou strukturou či velmi malou velikostí jednotlivých částic a tím jsou schopné iontových výměn nebo sorpce. Iontové výměny mohou významně ovlivnit fyzikální vlastnosti. Jílové materiály jsou schopny vázat vodu. Způsob navázání vody a také její množství ovlivňuje plastičnost, tvarovou stálost a jiná specifika daného materiálu. Jako další vlastnosti vykazují také stabilitu, reaktivitu, katalytickou aktivitu či reologické vlastnosti v disperzních roztocích [7].

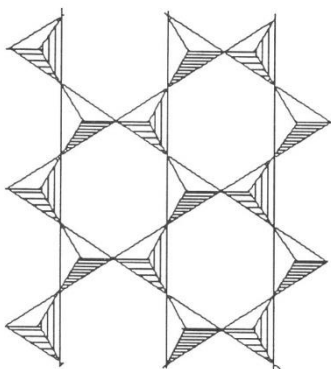
2.1.2 Fylosilikáty

Nejvýznamnější skupinou jílových minerálů, která se vyskytuje v zemské kůře, je skupina vrstevnatých silikátů, označována jako fylosilikáty. Fylosilikáty se často vyskytují ve starších sedimentárních horninách, ale jsou také základem dnešních sedimentů a půd. Z tohoto důvodu má jejich studium velký význam [8].

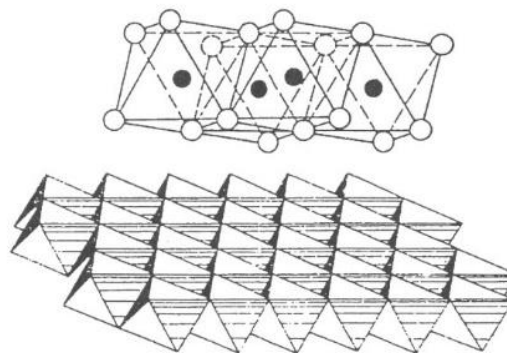
2.1.2.1 Struktura fylosilikátů

Pro všechny fylosilikáty je společná základní stavební jednotka. Tou je tetraedr SiO_4 , který je schopný díky třem atomům kyslíku tvořit dvojrozměrnou síť (Obr. 1). Z celkového hlediska lze vyčlenit skupinu tzv. planárních fylosilikátů, u kterých je síť tetraedrů doopravdy planární. Tento jev je vidět například u slídy či kaolinitu. Fylosilikáty, které nesplňují tuto podmínku, se označují jako fylosilikáty neplanární a periodicitu vrstev je narušena, ve struktuře dochází k ohybům nebo stočením. Přesto pro obě tyto skupiny platí, že se dokonale štěpí podle báze.

U dvourozměrné sítě jsou tetraedry propojeny třemi vrcholy. Čtvrtý směřuje kolmo nad nebo pod rovinu sítě. Kromě tetraedrů jsou součástí struktury také oktaedry. Pro oktaedry platí to stejné jako pro tetraedry – tvoří síť. Oktaedry spolu sdílí nejen vrcholy, ale také polovinu hran (Obr. 2). U oktaedrů tvoří tři atomy kyslíku (nebo hydroxylu) spodní vrstvu a tři anionty tvoří vrstvu horní. Mezi těmito vrstvami jsou uloženy oktaedrické kationty. Nejčastěji to jsou atomy hliníku, železa a hořčíku [9].



Obr. 1 Síť tetraedrů [9]



Obr. 2 Síť oktaedrů [9]

2.1.2.2 Propojení sítí ve fylosilikátech

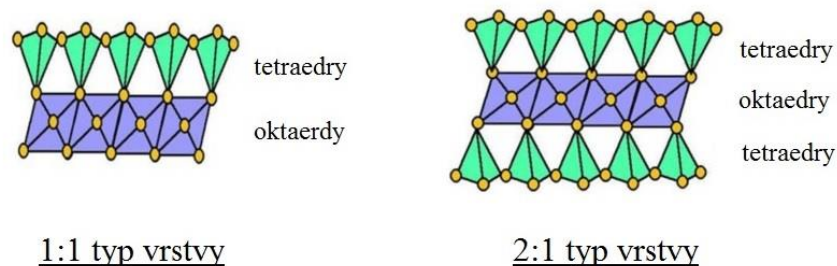
Jednotlivé typy sítí se ve strukturách fylosilikátů propojují následujícími způsoby:

- Dvě tetraedrické sítě jsou propojeny atomy bazálních kyslíků pomocí slabých van der Waalových sil nebo prostřednictvím mezivrstevního kationtu.
- Tetraedrická síť je propojena přes apikální kyslíky s kyslíky sítě oktaedrické nebo se propojují bazální kyslíky vrstvy tetraedrické s hydroxylovými skupinami oktaedrů prostřednictvím vodíkových můstků [9].

2.1.2.3 Dělení fylosilikátů

Způsob propojení kyslíku mezi vrstvami je důležitý pro další dělení fylosilikátů. Dochází ke vzniku dvou typů vrstev (Obr. 3):

- Vrstvy typu 1:1 – Tyto vrstvy jsou také označovány jako t-o. Dochází u nich k propojení jedné vrstvy tetraedrů (t) s jednou vrstvou oktaedrů (o). Tyto dvě sítě poté mají společnou jednu rovinu atomů kyslíku
- Vrstvy typu 2:1 – Též označené jako vrstvy t-o-t. Vznikají spojením vrstvy oktaedrů, k níž je z obou stran připojena vrstva tetraedrů. Tetraedrické sítě mají společnou polaritu. S oktaedry se obě vrstvy pojí jejich apikálními kyslíky [6][9].

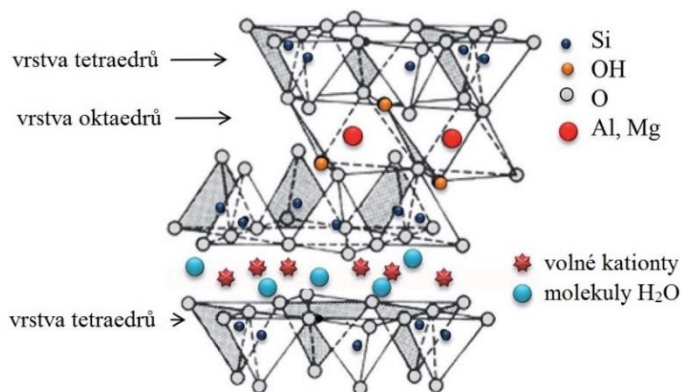


Obr. 3 Typy silikátového vrstvení [10]

Ve skutečných fylosilikátech jsou tyto typy vrstev mezi sebou kombinovány. Může docházet k pravidelným kombinacím. Ve většině případů vše vznikají různé nepravidelnosti. Prostory mezi jednotlivými vrstvami se nazývá mezivrství. Kombinace jedné vrstvy a mezivrství tvoří základní strukturní díl fylosilikátů a také určuje jeho složení [9].

Jednotlivé vrstvy mohou mít záporný či neutrální elektrický náboj, díky iontům, které ve své struktuře osahují. V závislosti na velikosti těchto nábojů dochází ke vznikům jednotlivých typů vazeb mezi jednotlivými vrstvami. Pokud jsou náboje malé, jednotlivé vrstvy na sebe působí slabými vazebnými silami a vodíkovými můstky zprostředkovanými molekulami vody. V případě, že je velikost náboje větší, jsou vazby zprostředkovány prostřednictvím mezivrstevních, zpravidla jednomocných, kationtů (Na^+ , K^+) [9].

Díky dobré adsorpci, velkému povrchu, negativnímu povrchovému náboji a vysoké iontovýměnné kapacitě jsou fylosilikáty výborným materiálem pro interakce s organickými molekulami a substráty [11]. Jílové minerály se využívají v katalýze [12], separaci [13], nanokompozitech [14] nebo biomedicině [15]. Pro již zmíněnou dobrou adsorpci jsou některé fylosilikáty typu 2:1 (Obr. 4) využívány v ochraně životního prostředí, jako nosiče pesticidů, ke stabilizaci kalů nebo např. k likvidaci radioaktivního odpadu [16]. Jílové minerály, konkrétně smektity se ukázaly být vhodným prekurzorem pro přípravu nanokompozitů polymer-silikát. U některých organických molekul dochází v důsledku interakce s jílovým minerálem ke změně optické aktivity. Jedním z důvodů může být fakt, že vrstevnaté silikáty jsou transparentní ve velkém rozptylu vlnových délek a změna optické aktivity je tudíž snadno detekovatelná [17].



Obr. 4 Struktura fylosilikátu, typ 2:1, smektit [18]

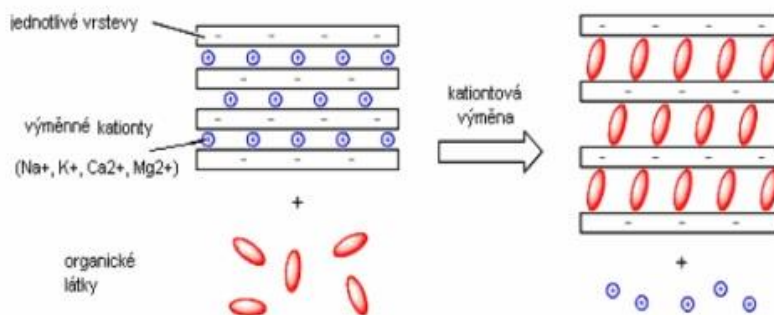
2.1.3 Modifikace jílových materiálů

Použití běžných jílů, jako jsou kaolin či smektit, je omezené z důvodu jejich špatné rozpustnosti ve vodě. Bylo tedy nutné připravit modifikované jíly, které se vyznačují dobrou rozpustností ve vodě, u kterých bude také docházet k reakci s vybranými molekulami a substráty [5]. Různě modifikované přírodní jílové materiály jsou využívány v mnoha odvětvích průmyslu. Při modifikaci jílových materiálů dochází k sycení mezivrstevního prostoru kationty, také mohou být do těchto prostorů interkalovány velké anorganické kationty či celé organické molekuly. Přírodní jílové minerály nikdy neobsahují pouze kationty jednoho prvku, ale vždy kombinaci více. O vlastnostech minerálů poté rozhodují kationty toho prvku, který je zastoupen nejpočetněji. Reologické vlastnosti materiálu mohou být ovlivněny sodnými kationty. Tepelnou stabilitu jílových materiálů lze ovlivnit hlavně interkalací velkých anorganických kationtů [6]. Jednou z důležitých modifikací je tzv. organofilizace. Během tohoto procesu dochází k interkalaci organických molekul a vzniká anorganicko-organický komplex. Tyto komplexy se vyznačují jinými vlastnostmi, než jaké mají nemodifikované jílové materiály. Dochází ke ztrátě hydrofilicity a jílový minerál se mění na hydrofobní organickou makromolekulu schopnou reagovat s organickými látkami. Vznikem anorganicko-organických komplexů dochází také k navýšení mechanické a chemické stability. Komplexy jsou ekologicky nezávadné a jejich příprava není cenově ani materiálově náročná na přípravu [16].

2.1.3.1 Organofilizace

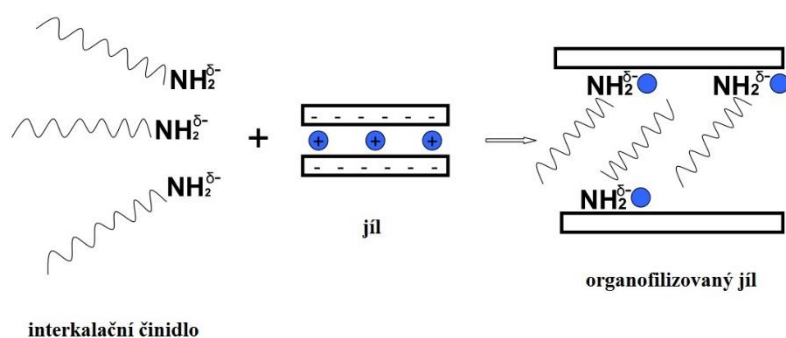
Za organofilizaci lze označit způsob modifikace jílových minerálů, kdy se mezi jednotlivé vrstvy síti oktaedrů a tetraedrů interkalují organické molekuly. Tímto procesem dochází k nárůstu vzdálenosti mezi sítěmi. Interkalaci lze provést dvěma způsoby.

První metoda je ionto-výměnná (Obr. 5) a také ji lze označit za tzv. „mokrou“ cestu. Je postavena na schopnosti jílového minerálu sorbovat jisté kationty a udržovat je ve výměnném stavu. Kationty, které mají být interkalovány se nachází ve formě vodného roztoku. Odtud tedy pojem „mokrý“. Aby byla metoda účinná, je zapotřebí použít interkalační činidla, která se budou vyznačovat afinitou k polárnímu jílovému minerálu, ale i k nepolárnímu polymeru. Nejčastěji využívanými interkalačními činidly jsou aminokyseliny a kladně nabitě alkylamoniové organoionty [6][19][20].

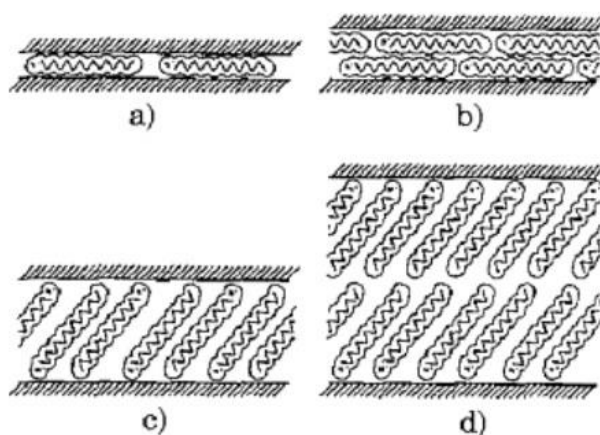


Obr. 5 Metoda výměnou iontů [21]

Druhou možností jak interkalovat organické látky do jílového minerálu je ion-dipólová metoda (Obr. 6). Tento způsob postupu je naopak označován jako „suchá“ cesta. Interkalace probíhá nejen v roztoku interkalačního činidla, ale také v jeho tavenině. V této metodě se využívá přitažlivých sil mezi dipólem aminové skupiny a kladným nábojem zprostředkovaným příslušným křemičitým povrchem. Během metody se vrstvy minerálu od sebe vzdalují. Pokud je použita vhodná organická sloučenina, dojde později k navýšení interkalace s vybraným polymerem, jejichž kombinací má vzniknout finální požadovaný nanokompozit. Pozitivním faktorem tohoto typu začlenění organických látek je, že po skončení interkalace není nutné odstraňovat ze systému vedlejší nechtěné produkty reakce. „Suchou“ cestu lze využít také u jílových minerálů, u kterých již nějaký typ modifikace proběhl. Uspořádání organických látek v mezivrstvích jílového materiálu je ovlivněno několika faktory jako velikost náboje, typu vrstev nebo mezivrstev a také na druhu organického kationtu interkalované látky. Po ovlivnění interkalovaných molekul těmito faktory, dochází ke vzniku čtyř různých druhů vrstev. Tyto vrstvy se označují jako: vrstvy jednoduché, dvojité, pseudomolekulární a vrstvy parafinového typu (Obr. 7) [1][6][19][20].



Obr. 6 Ion-dipólová metoda interkalace [21]



Obr. 7 Typy interkalovaných organofilizovaných vrstev a) jednoduchá b) dvojitá c) jednoduchá parafinovaná d) dvojitá parafinovaná [21]

2.1.4 Synteticky připravené fylosilikáty

Stejně jako v jiných odvětvích i v chemických syntézách jsou nejdůležitějšími cíli připravit požadovanou sloučeninu v co nejjednodušších podmínkách, s minimálními počátečními náklady, aby výsledný produkt dosahoval vysoké čistoty a aby výsledné množství bylo co nejvyšší. V případě fylosilikátů se nabízí nejpříznivější cesta přípravy v jednokrokové reakci za nízkých teplot, zahrnující kopolymerizaci hořečnatých kationtů s vybranými alkoksysilany v alkalickém prostředí. Problém mohou představovat Fe^{2+} a Ni^{2+} kationty, které výrazně ovlivňují vlastnosti fylosilikátů. Výhody syntetizovaných fylosilikátů vůči přírodním jsou hlavně v jejich vysoké chemické čistotě, homogenosti vzorků a možnosti kontrolovat jejich pórovitost. Potencionální budoucnost fylosilikátových hybridů je v možnosti vytvoření reakčních postupů za účelem možnosti interkalace dalších typů organických sloučenin do struktury fylosilikátů. V takových molekulách poté vznikají nová aktivní místa, na kterých může docházet k dalším chemickým reakcím. Inkorporované alkoksysilany poskytují organické řetězce, které jsou spojeny s anorganickou maticí. Tím dochází k výrazné změně vlastností. Příkladem může být uveden křemičitan, na jehož vrstvě jsou navázané aminoskupiny. Tato kombinace vede k chemickým a fyzikálním změnám, které jsou podobné vlastnostem silikagelu [22].

2.2 Aminojíl

2.2.1 Aminojíl obecně

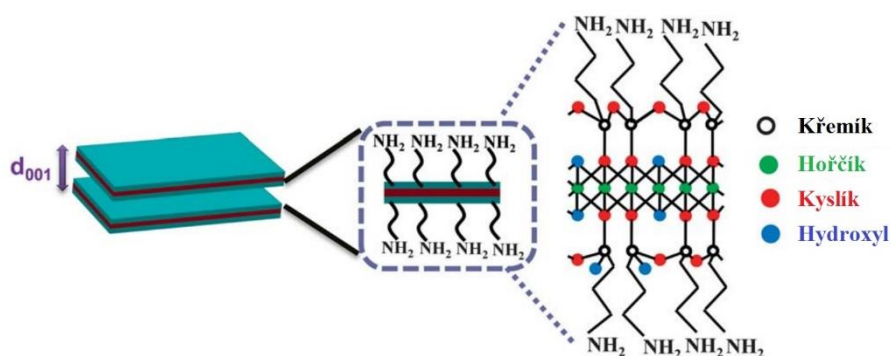
Uměle nasyntetizovaný aminojíl tvoří jednu z hlavních tříd fylosilikátů. Navázáním funkcionalizované organické molekuly kovalentní vazbou na anorganický podklad, dochází ke vzniku zcela nové skupiny anorganicko-organických hybridů se zcela unikátními vlastnostmi, které doposud našly uplatnění mimo jiné v distribuci léčiv, katalýze, senzorce a odstraňování znečištění. Výhodou aminojilu je také jeho poměrně jednoduchá laboratorní příprava, sorpční schopnosti, termální a mechanická stabilita aj. I přes možné chemické modifikace, je ve většině případů používán aminojíl, který má ve své struktuře oktaedry atomy hořčíku. Tyto atomy mohou být substituovány niklem, vápníkem nebo mědí. Takto připravené aminojily mohou být použity k imobilizaci jednotlivých biomolekul a proteinů. Příkladem lze uvést DNA, Hb, Mb, GOx. Bylo zjištěno, že tyto molekuly po navázání na aminojíl vykazují zvýšenou stabilitu a regeneraci bez ztráty aktivity [23].

2.2.2 Struktura aminojilu

Základní anorganickou maticí aminojilu je fylosilikát typu 2:1 s trioktaedrickou strukturou smektitu (Obr. 8). Tato forma není příliš vzdálená od té, kterou lze nalézt v přírodě. Aminojíl má strukturní tvar krystalické mřížky tvořené dvourozměrnými vrstvami. Vnitřní oktaedrický list často obsahuje atomy hořčíku nebo hliníku, společně s hydroxylovými skupinami. Na oktaedrický list nasedají z obou stran tetraedry, ty jsou tvořeny anionty křemíku a kyslíku. Vnější vrstvy tetraedrů sdílejí s oktaedry kyslíkové ionty. Celková tloušťka vrstvy je kolem 1 nm. Boční rozměry vrstvy mohou být v rozmezí od 300 Å do několika mikronů. Rozměry mohou být ale i větší, závisí na přítomném druhu křemičitanu. Jednotlivé vrstvy jsou pomocí van der Waalsových sil přitahovány k sobě do stohů a mají mezi sebou pravidelné mezery. Možnými substitucemi kationtů (např. Al^{3+} nahrazen Mg^{2+}) vzniká ve vrstvách záporný náboj,

kteřý je kompenzován kationty kovů alkalických zemin nebo alkalických kovů, které jsou v jednotlivých mezivrstvách. Van der Waalsovy síly nejsou nijak silné vazebné interakce, takže u sebe jednotlivé stohy nedrží příliš velkou silou, z toho důvodu je tedy velmi snadná interkalace, hlavně malých molekul, do mezivrstev aminojílu. Pokud je potřeba, aby byl fylosilikát organofilnější, je nutné nahradit hydratované kationty z mezivrstev povrchově aktivními kationty jako je alkylfosfonium nebo alkylamonium [24].

Aminopropylvé skupiny jsou navázány na fylosilikátovou matici kovalentními vazbami. Obecný vzorec hořečnatého fylosilikátu, konkrétně aminojílu je $R_8Si_8Mg_6O_{16}(OH)_4$ (Obr. 8). R je v tomto případě $NH_2(CH_2)_3$. Atomy křemíku a kyslíku (Si-O) jsou k sobě vázány kovalentní vazbou. Ve struktuře aminojílu tvoří nepolární siloxalové skupiny (Si-O-Si) a polární silanové skupiny (Si-OH) tzv. aniontová centra [4] [8]

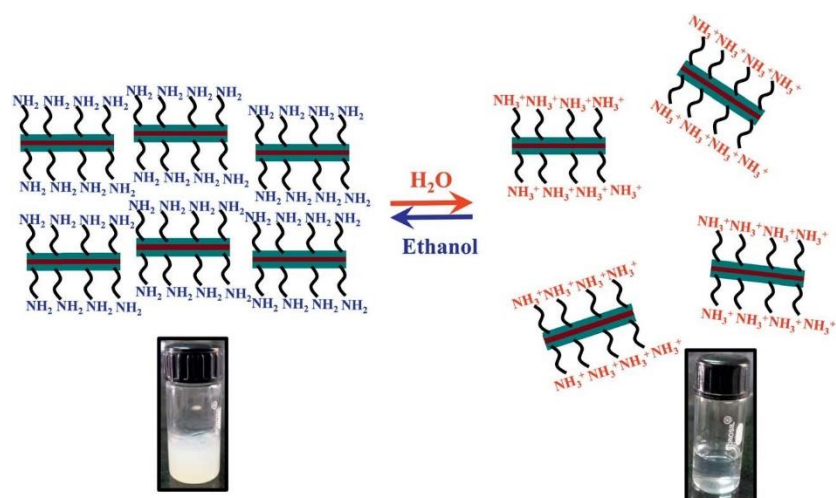


Obr. 8 2D struktura hořečnatého aminojílu [4]

2.2.3 Vlastnosti aminojílu

Povrchové vlastnosti aminojílu jsou závislé na jeho chemickém složení, množství hydroxylových skupin, počtu atomů kyslíku ve struktuře, velikosti náboje vrstev, druhu kationtů v mezivrstevní nebo strukturních nedokonalostech [1]. Volba organotrialkoxysilanu ovlivňuje délku a typ postranních organoskupin [25].

Aminojíly lze podrobit tzv. exfoliaci. Ta může být způsobena přidáním polárního rozpouštědla, např. vody. Dochází k protonaci aminových skupin a heterogenní katalýzou vzniká čirá disperze. Proces lze vrátit přidáním rozpouštědla, které je méně polární než rozpouštědlo použité k exfoliaci organojílových vrstev, například ethanol (Obr. 9). Z vrstev, u kterých došlo k exfoliaci, lze pomocí ultrazvuku získat částice o velikosti nanometrů. Tyto nanočástice vykazují schopnost obalit biomolekuly, jako jsou enzymy nebo deoxyribonukleonová kyselina (DNA), a vytvořit tak funkční hybridní materiály [4].



Obr. 9 Schéma exfoliace aminojílu [4]

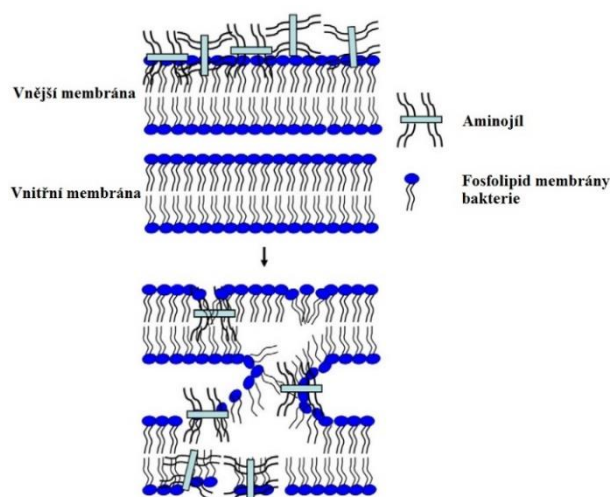
Množství jílu, které bude exfoliováno lze ovlivnit pomocí pH využitého média. Zeta potenciál aminojílu byl při pH 9,6 (bez jakýchkoliv pH modifikací) stanoven na hodnotu +25 mV. V rozmezí koncentrací, od $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ do $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ hořečnatého aminojílu, hodnoty zeta potenciálu stoupají od +20 mV do +30 mV. To je způsobeno protonací aminů na navázaných propylaminových skupinách. Přítomné aminoskupiny nejenže napomáhají ve vodě k exfoliaci, ale také dochází při vazbě s kovovými nanočásticemi k výraznému navýšení stability [4][26]. Přidání nízkopolárního rozpouštědla (např. ethanol) vyvolává tzv. stohování a následné vysrážení aminojílu způsobené deprotonací. Navázané aminoskupiny nejen výrazně přispívají k exfoliaci vrstev ve vodě, ale také navyšují stabilitu kovových nanočástic, se kterými může aminojíl tvořit komplexy. Aminojílem stabilizované nanočástice mají aplikaci ve vodné a bifázové katalýze. V případě bifázových reakcí ale nastává jisté omezení využitelnosti z důvodu špatné dispergovatelnosti v prostředí voda/organická látka.

Aminojíl může být tedy využit jako heterogenní nosič nanočástic kovů. Tyto nanočástice, které nepřesahují velikost 10 nm, jsou snadno dispergovatelné na vrstvách aminojílu. Kovové nanočástice zakomponované do aminojílu vykazují katalytické vlastnosti a lze je tedy využít jako katalyzátory hydrogenačních reakcí. Komplexy aminojíl-kov, mají tedy obrovský potenciál v katalýzách nebo optice. Bylo zjištěno, že membrány obsahující nanočástice Pt nebo Cu jsou katalyticky velice účinné při redukci toxických látek. Měděné nanočástice jsou velice citlivé na oxid vápenatý a na vzduch. Díky plynové bariéře, kterou mají aminojíly lze oxofilní nanočástice velmi dobře stabilizovat [4].

Uplatnění našli aminojíly také při přípravě nanokompozitů. Díky kladnému náboji vrstev aminojílu ve vodných roztocích představuje aminojíl výborné síťovací činidlo pro organické polymery a je tak možné připravit hydrogelové nanokompozity a filmy s vylepšenými vlastnostmi, hlavně větší mechanickou odolností. Kladně nabitě aminojílové vrstvy také mohou být využity jako vodné dispergované scaffoldy pro organizaci chromoforů, které umožňují účinné přenosy energie. Protonace založená na pH a pozitivní náboj aminojílu byly zkoumány v souvislosti s přenosem léčiv a zapouzdřování molekul. Záporně nabitě molekuly/léčiva byly

enkapsulovány a následně došlo k jejich řízenému uvolňování. Neobvyklou vlastností vrstevnatých aminojílů je schopnost inkorporovat celou řadu hostujících molekul do rozměrově omezených mezivrstevních prostorů. Pozitivní náboj vrstev, mezivrstevní prostory a záporný náboj biomolekul umožňuje přípravu nanostruktur typu „core-shell“ (jádro-skořápka). Díky své biokompatibilitě, vysoké adsorpční schopnosti a možnosti řízeného uvolňování jsou aminojíly stále více zkoumány a spojovány s možností využití pro biologické účely [4].

Antimikrobiální účinky hořčnatého aminojíly byli s pozitivním výsledkem vyzkoušeny na *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Antimikrobiální účinky aminojílu jsou přisuzovány aminopropylovým skupinám a jejich náboji, které také vytvářejí řadu vazebných míst pro iontovou výměnu uvnitř mezivrstevních prostorů. Bylo pozorováno, že během prvních 2 hodin antimikrobiální účinky aminojílu způsobily smrt 95 % bakterií použitých při experimentu. Možným vysvětlením může být schopnost aminojílu depolarizovat membránové struktury bakterií, což vede k úniku intracelulárních enzymů (Obr. 10) [27].



Obr. 10 Schéma poškození membrány bakterie způsobené aminojílem [27]

Toxicita aminojílu byla zkoumána na základních buňkách vazivové tkáně (fibroblastech) a na rakovinových buňkách (např. epitelální, MRC-5 u plicních fibroblastů, A549 rakovina plic) při měnící se době expozice a koncentraci. Za použití 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) a laktátu dehydrogenázy (LDH) byla zjištěna pouze velmi malá toxicita u všech testovaných buněk i při koncentraci $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Ani při zdvojnásobení koncentrace ($1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) nedošlo k žádnému závažnému ovlivnění viability buněk, stejně tak nedošlo k poškození membrán. Na aminojílu přítomné aminoskupiny navyšují dostupnost buněk a zároveň snižují cytotoxicitu i ve vysokých koncentracích. Potenciální toxicita ve vodě rozpustného aminojílu je velmi nízká. Nedochází k závažnému poškození membrán, apoptóze nebo proliferaci buněk i při tak vysokých koncentracích jako je $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [4][28].

2.2.4 Syntéza aminojílu

Hořečnatý fylosilikát, substituovaný aminopropyllovými skupinami, může být připraven jednoduchou sol-gel metodou za laboratorní teploty. Základní kostru zajišťuje hexahydrát chloridu hořečnatého (0,84 g), který je za stálého míchání rozpuštěn v ethanolu (25 mL, lab. ethanol). Rozpuštěním chloridu dojde k získání čirého roztoku a oktaedrické vrstvy s kationty hořčíku jsou připraveny pro následující kroky syntézy. Za stálého míchání je po kapkách přidáván 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES, 1,3 mL). Tetraedry SiO_4 jsou spojeny k oktaedrům a dochází k tvorbě jednotlivých vrstev aminojílu. K tetraedrům jsou zároveň vázány také aminopropyllové skupiny. Přikapáváním APTESu mění suspenze pomalu barvu, z bezbarvé na mléčnou. Následně je suspenze nepřetržitě míchána, aby došlo k úplnému odpaření rozpouštědla a ke vzniku krystalické hmoty. Tato hmota je následně opět rozpuštěna v deionizované vodě (10 mL). Během toho je využit také ultrazvuk, aby došlo k dokonalému rozpuštění. Z tohoto roztoku je aminojíl vysrážen přidávkem ethanolu (50 mL, lab. ethanol). Takto připravená suspenze je odstředěna, supernatant odlit a bílý sediment znovu promyt novým přidávkem ethanolu (96% ethanol) a opět odstředěn. Takovéto promývání a následná centrifugace je 2-3x opakována. Finální sediment je vysušen v sušárně při teplotě nepřesahující 50 °C. Vysušený aminojíl nabývá podoby bílo-žlutých krystalků [4].

Ve struktuře takto nasyntetizovaného aminojílu jsou Si^{4+} atomy tetraedrů spojeny s oktaedry, které obsahují Mg^{2+} kationty. Atomy Mg^{2+} mohou být nahrazeny jinými kationty, např. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ce^{3+} , Al^{3+} a Fe^{3+} . Nejen kladně nabití ionty mohou být substituovány. Lze připravit také aminojíl obsahující ve své struktuře substituované chloridové anionty. Existuje také mnoho organosilanů, které mohou být využity k připojení nejen aminových, ale také fenolových, hydroxylových či thiolových skupin do struktury [29].

2.3 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou látky o vysoké molekulové hmotnosti. Ve své struktuře obsahují postranní skupiny, které jsou schopné elektrolyticky disociovat. Elektrolytickou disociací vzniká makroion, který v roztocích nese elektrický náboj [3].

Zvláštním případem polyelektrolytů jsou látky označované jako polyamfolyty. Tyto látky obsahují ve své struktuře jak zásadité, tak kyselé skupiny [30]. Elektrický náboj takovéto molekuly poté závisí na hodnotě pH roztoku, ve kterém se nachází. Pokud se pohybujeme v oblasti nízkého (kyselého) pH, dochází k disociaci pouze bazických skupin. Ve vysokém pH je to poté obráceně – dochází k disociaci kyselých skupin. Jestliže je hodnota pH roztoku v neutrální oblasti, dochází k disociaci jak u kyselých, tak u bazických skupin. Dochází ke vzniku tzv. obojetných iontů (amfionů). Pokud je v molekule stejné množství kladného i záporného náboje, molekula se navenek chová jako elektricky neutrální a dosáhla svého izoelektrického bodu [3].

Mnoho významných polyelektrolytů je přírodního typu, například pektin, zástupce aniontových polysacharidů nebo želatina, patřící do skupiny proteinů. Polyelektrolyty s bazickými skupinami nejsou tolik běžné. Velký význam mají také modifikované formy přírodních polyelektrolytů, jako jsou škrob nebo celulóza [30].

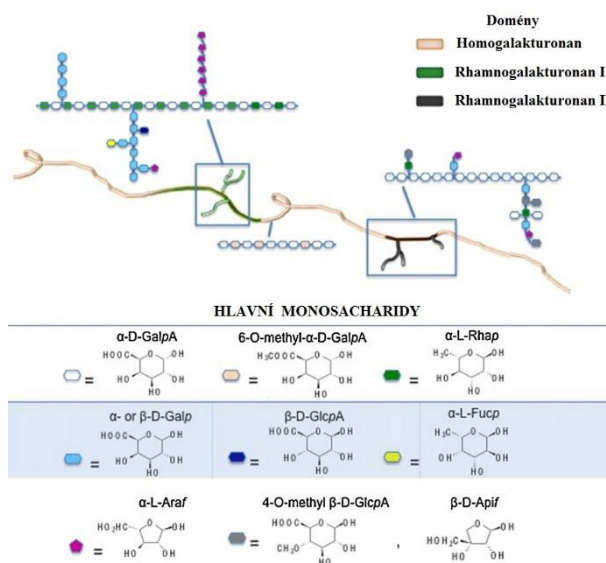
2.3.1 Pektin

Pektin je polymer přírodního původu, který tvoří buněčné stěny většiny rostlin a je široce používán v potravinářském průmyslu jako zahušťovadlo nebo stabilizátor. Obvykle se získává z několika druhů ovoce (např. citrusy, jablka, rajčata) chemickými nebo enzymatickými metodami [31].

Pektin je rozvětvená makromolekula s vysokou molekulovou hmotností, která může být přeměněna na hydrogely, které mohou bobtnat a nejsou rozpustné ve vodě. Vysoce koncentrované roztoky o nízkém pH usnadňují tvorbu spletených spirál, což vede k získání fyzikálních gelů. Kromě toho mohou být ve vodě nerozpustné gely získány s použitím dvojmocných nebo trojmocných kationtů. Tento jednoduchý gelovací mechanismus vzbuzuje zájem o přípravu hydrogelů a jejich následné použití v biomedicině jako je dodávání léčiv, dodávání genů, tkáňové inženýrství a hojení ran [31].

Pektin se skládá z nejméně tří polysacharidových domén: homogalakturonan (HGA), rhamnogalakturonan I (RG-I) a rhamnogalakturonan II (RG-II). Hlavní složku, polysacharidů řazených do skupiny pektinů, tvoří HGA a obsahuje α -(1 \rightarrow 4) glykosidicky vázané D-galakturonové kyseliny, které jsou částečně methyl-esterifikované. Vzhledem ke stupni esterifikace (DE) jsou pektiny klasifikovány jako nízkomethoxylované (LM, DE < 50 %) nebo vysokomethoxylované (HM, DE > 50 %). Tyto dvě skupiny potom vykazují odlišné vlastnosti. Bylo zjištěno, že tyto charakteristiky značně ovlivňují vlastnosti vytvořených gelů a z toho důvodu je nutná pečlivá kontrola, aby byly splněny požadavky dané biomedicínské aplikace [32].

RG-I se skládá z disacharidové jednotky kyseliny galakturonové a rhamnózy [1,4- α -D-GalpA-1,2- α -L-Rhap-] $_n$. 20 – 80 % zbytků Rhap je substituováno neutrálními oligosacharidy, zejména arabinofuranózou a galaktózou (α -L-Araf a β -D-Galp). Dále fruktóza, glukopyranóza a 4-O-methylglukopyranóza (α -L-Fucp, β -D-GlcpA a 4-O-methyl- β -D-GlcpA) mohou být nalezeny jako koncové zbytky postranních řetězců (Obr. 11) [31].



Obr. 11 Model struktury pektinu a jednotlivých složek [31]

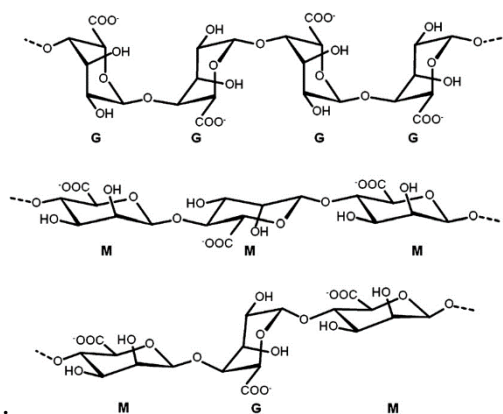
RG-II má strukturu složitější. Představuje malou páteř zbytků 1,4- α -D-GalpA a postranních řetězců různých cukrů, jako je např. rhamnóza, kyselina galakturonová, galaktóza, arabinofuranóza nebo apiofuranóza (α -L-Phap, α -D-GalpA, α - nebo β -D-Galp, α -L-Araf, β -D-Apif) a mnoho dalších [31].

Jak jsou tyto tři domény sestaveny, není ještě známo. Typická hypotéza se týká modelu, ve kterém jsou kostry HGA, RG-I a RG-II kovalentně zesíťeny za vzniku blokových kopolymerů (Obr. 11). Alternativní „hladké“ oblasti jsou tvořené lineární páteří nerozvětvených HGA zbytků střídavě spojených s rozvětvenými zbytky RG-I [33][34]. Nedávné studie však uvádějí další možné modely struktury pektinu. Z biomedicínského hlediska může být pochopení organizace pektinových domén základem pro přizpůsobení buněčné adheze a mukoadhezivních nebo antimetastatických vlastností pektinových gelů a pro tvorbu mechanicky stabilních gelů [31].

Molekulová hmotnost pektinu a stupeň esterifikace určují, zda může docházet ke gelování nebo ne a zároveň ovlivňují vlastnosti gelů. Další parametry, jako je teplota, hodnota pH nebo přítomnost kationtů, je třeba také zvážit při přípravě pektinového gelu. Esterifikační vzorce se liší podle chemických nebo fyzikálních činidel použitých při extrakci. Kyselá deesterifikace způsobuje náhodné rozdělení, zatímco enzymatická degradace pektinesterázy vede k blokové distribuci methylesterových skupin. Pozitivní náboje potřebné k vytvoření pektinových gelů mohou být získány z jiných polykationtových polysacharidů, jako je např. chitosan. Elektrostatické interakce mezi opačně nabitými polysacharidy poskytují tvorbu fyzikálních hydrogelů s kontrolovanými vlastnostmi. Celkově byly pektinové gely získány v mnoha fyzikálních podmínkách a formách, včetně mikro- a nanočástic, filmů a povlaků [31].

2.3.2 Alginát

Alginát je sůl kyseliny alginové. Tento polymer je tvořený 2 základními monomery: L-guluronátem (G) a D-mannuronátem (M). Za alginát je v dnešní době označována celá skupina lineárních kopolymerů, které obsahují bloky (1 \rightarrow 4) přípojných β -D-mannurátových (M) a α -L-guluronátových (G) zbytků. Jednotlivé bloky mohou být v řetězci mezi sebou různě kombinované. Jednou z možností je nepřetržité řazení zbytků (GGGGGG, nebo MMMMMM), nebo se mohou jednotky G a M v řetězci střídát (GMGMGM) (Obr. 12). Algináty extrahované z různých zdrojů se liší obsahem G a M jednotek a také délkou každého bloku [35]



Obr. 12 Chemická struktura G a M jednotek a jejich možné řazení v blocích polymeru [35]

Komerčně je alginát získáván z hnědých řas (*Phaeophyceae*). Algináty vzniklé bakteriální biosyntézou mívají více definovanou chemickou strukturu a fyzikální vlastnosti. Jako zdroje bakteriálního alginátu jsou využívány bakterie rodu *Azotobacter* a *Pseudomonas*. Nedávný pokrok v regulaci biosyntézy alginátu u bakterií a relativní snadnost modifikace bakterií umožňuje produkci alginátu s konkrétními požadovanými vlastnostmi potřebnými v dané aplikaci. To umožňuje použití alginátu v široké oblasti možných aplikací, včetně biomedicíny. V současné době se vyrábí více než 200 různých druhů alginátu. Rozsah obsahu G bloků v různých typech alginátů je poměrně velký. U *L. hyperborean* je zastoupení G bloků 60 %. U ostatních komerčně vyráběných alginátů se zastoupení G bloků pohybuje v rozsahu 14 – 31 % [35].

Předpokládá se, že pouze G bloky alginátu se účastní intermolekulárního zesíťení s dvouvalentními kationty (např. Ca^{2+}) za vzniku hydrogelů. Faktory ovlivňující vlastnosti alginátu a výsledných hydrogelů jsou tedy kompozice (tj. poměr M/G), sekvence, délka G bloku a molekulová hmotnost makromolekuly. Pokud dojde k navýšení délky G bloku stejně jako k navýšení molekulové hmotnosti, dojde také ke zvýšení mechanické odolnosti alginátu. Je důležité poznamenat, že různé zdroje alginátů poskytují polymery s celou řadou chemických struktur. Chemickou strukturou jsou ovlivněny také fyzikální vlastnosti, které následně ovlivňují např. stabilitu gelů nebo rychlost uvolňování léčiva z gelu [35].

U komerčně dostupných alginátů se molekulová hmotnost pohybuje v rozmezí 32 000 a 400 000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Viskozita alginátových roztoků se zvyšuje s klesající hodnotou pH a dosahuje maxima kolem pH 3. To je způsobeno protonací karboxylových skupin v hlavním řetězci alginátu a dochází k tvorbě vodíkových můstků. Navyšováním molekulové hmotnosti makromolekuly alginátu lze zlepšit fyzikální vlastnosti výsledných gelů [35].

Biokompatibilita a cytotoxicita alginátu je tématem mnoha debat. Bylo popsáno, že algináty s vysokým obsahem M jsou imunogenní a přibližně 10krát účinnější při indikaci cytokinů ve srovnání s vysokými algináty G [36]. Jiné studie uvádí, že u alginátových implantátů je imunoresponse jen velmi malá nebo žádná [37]. Imunogenní odpověď v místě injekce nebo implantace může být přisuzována nečistotám, které zůstávají v alginátu. Jelikož alginát je získáván z přírodních zdrojů, mohly by do živočichů potencionálně proniknout různé nečistoty, jako jsou těžké kovy, endotoxiny, proteiny a polyfenolické sloučeniny [38]. Podobně nebyla pozorována žádná významná protizánětlivá odezva, když byly myším subkutánně injikovány gely vytvořené z komerčně dostupného, vysoce čistého alginátu [35][39].

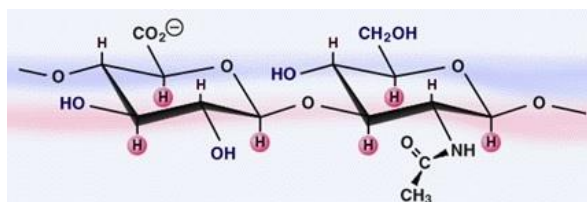
Alginátové hydrogely jsou hojně využívány v biomedicině k hojení ran, aplikaci léků a v aplikacích tkáňového inženýrství [40]. Nejběžnějším způsobem přípravy alginátových hydrogelů z vodného roztoku je spojit roztok se síťovacími činidly, jako jsou dvojmocné kationty (tj. Ca^{2+}). Předpokládá se, že struktura bloků guluronátu umožňuje vysoký stupeň koordinace dvojmocných iontů. Guluronátové bloky jednoho polymeru pak tvoří spojení s guluronátovými bloky sousedních polymerních řetězců, což vede ke struktuře gelu. Chlorid vápenatý (CaCl_2) je jedním z nejčastějších způsobů, který vede k rychlé, ale špatně řízené gelaci v důsledku jeho vysoké rozpustnosti ve vodných roztocích. Jedním z přístupů k pomalé a regulační gelaci je použití pufru obsahujícího fosfát, protože fosfátové skupiny v pufru

„soutěží“ s karboxylovými skupinami alginátu v reakci s kationty vápníku a zpomalují tak rychlost gelace [35].

2.3.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová byla objevena ve 30. letech 20. století německým biochemikem Karlem Meyerem. Určení přesné chemické struktury kyseliny trvalo 20 let. V dnešní době je častěji používáno označení hyaluronan, protože v přírodě se tato látka vyskytuje ve formě polyaniontu. Záporný náboj bývá kompenzován K^+ , Na^+ , Mg^{2+} nebo Ca^{2+} kationty [41][42].

Strukturně je hyaluronan řazen do skupiny β -glukanů. Základní opakující se disacharidová jednotka je složena z D-glukoronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu, spojení zprostředkováno β -(1 \rightarrow 4) a β -(1 \rightarrow 3) glykosidickou vazbou (Obr. 13).

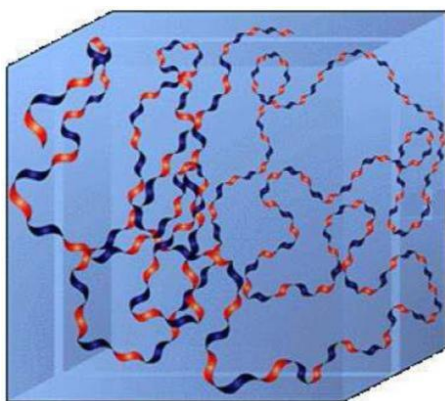


Obr. 13 Struktura opakující se disacharidové jednotky hyaluronanu [41]

Jakékoliv molekuly se vždy snaží zaujmát to nejvýhodnější energetické uspořádání. Z toho důvodu jsou velké funkční skupiny (hydroxylové a karboxylové skupiny a anomerní uhlík vedlejšího sacharidu) ve struktuře hyaluronanu ve stericky výhodné ekvatoriální poloze. Atomy vodíku, které nejsou tak objemné jsou v poloze axiální [41].

Struktura makromolekuly je lineární a nevětvená. Opakující se disacharidový monomer může tvořit polymerní řetězec delší než je 10 000 jednotek. Molární hmotnost hyaluronanu pak může dosáhnout i hodnot 10^7 Da ($1 \text{ Da} = 1/12 m^{12}_C$). Tato vysoká molární hmotnost souvisí s unikátními reologickými a viskoelastickými vlastnostmi. Z těchto důvodů má hyaluronan důležitou fyziologickou roli v živých organismech a proto je hojně využíván v medicínských aplikacích nebo spotřebním průmyslu, např. v kosmetice [43].

Pokud se hyaluronan nachází v prostředí fyziologického roztoku, jeho hlavní řetězec je stabilizován interakcí s rozpouštědlem, chemickou strukturou disacharidu a vnitřními vodíkovými můstky. Polárnější, hydrofilní část makromolekuly hyaluronanu zajišťují skupiny v ekvatoriální poloze. Naopak vodíky v axiální poloze tvoří nepolární a poměrně hydrofobní oblast. Díky těmto oblastem má hyaluronan typickou nepravidelnou, spirálovitě stočenou strukturu (Obr. 14). Struktura zabírá velkou oblast neboli doménu. Uvnitř domén je koncentrace nízká, odhaduje se 0,1 % (obj/hm). Z toho lze usuzovat, že při vyšších koncentracích než je 1 mg hyaluronanu na 1 mL roztoku se domény jednotlivých molekul překrývají [41][44].



Obr. 14 Model 3D struktury hyaluronanu v doméně; doména - modrá krychle, modrá - hydrofilní část, červená - hydrofobní část makromolekuly [41]

Struktura může také nabýt tvaru dvojnásobné šroubovice. K tomuto jevu dojde v případě, že vzorky v pevné fázi mají hodnotu pH nižší než by měly v normálních fyziologických podmínkách. Každá jednotka je vůči sousedícím disacharidovým jednotkám pootočena o 180° , z toho vyplývá, že po každých dvou otočeních dojde k návratu k původní orientaci. Důležitým stabilizačním faktorem za těchto podmínek je přítomnost molekul vody. U zvýšeného pH také dochází k tvorbám mnohonásobných šroubovic s jejich výsledná struktura je závislá na typu kationtu vázaného k makromolekule [42].

Hyaluronan se vyskytuje jak v těle obratlovců, tak i v tom lidském. Největší koncentrace je k nalezení v mezibuněčné hmotě měkkých pojivových tkání. Některé bakterie mají hyaluronan ve struktuře kapsulí. Hyaluronan se nevyskytuje v houbách, hmyzu a rostlinách. Výskyt hyaluronanu v jednotlivých typech tkání a organismů jsou i s koncentracemi uveden v Tab 1 [43].

Tab. 1 Výskyt hyaluronanu v různých typech živočišné tkáně a jeho koncentrace [43]

Tkáň nebo tělesná tekutina	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Kohoutí hřebínek	7 500
Lidská pupeční šňůra	4 100
Lidská synoviální (kloubní) tekutina	1 400 – 3 600
Hovězí nosní chrupavka	1 200
Lidský sklivec	140 – 340
Lidská škára	200 – 500
Lidská pokožka	100
Králičí mozek	65
Králičí srdce	27
Lidská hrudní míza	0,2 – 50
Lidská moč	0,1 – 0,3
Lidská krevní plazma	0,01 – 0,1

Ačkoliv primární struktura hyaluronanu není složitá, jeho biologické funkce jsou velmi rozmanité a někdy jsou dokonce protichůdné. Vlastnosti závisí hlavně na velikosti molekuly. Pro velké zesíťované molekuly polymerů, které vyplňují velký objem, jsou typické imunosupresivní a antiangiogenní vlastnosti. Středně velké makromolekuly složené z 20 – 25 disacharidových jednotek vykazují protizánětlivé účinky, podporují imunitu a stejně jako předešlá skupina působí antiangiogenně. Malé oligomery hyaluronanu jsou schopné fungovat jako výstražné signální molekuly, indikátory proteinů teplotního šoku a také brání usmrcení buněk.

Hyaluronan je široce uplatňován v medicíně. Využívá se k vytvoření prostoru kolem chirurgického zákroku, např. u očních operací nebo je s jím chráněna citlivá tkáň. Hyaluronan je také schopný vyplňovat a posilnit místa mezi jednotlivými tkáněmi. Zabraňuje také adhezi a tvorbě jizev pokud jím zabráníme kontaktu mezi zraněním nebo chirurgicky způsobeným poškozením tkáně a okolní tkání, u které k žádnému poškození nedošlo. V případech zánětů kloubů lze hyaluronan využít jako náhradu za synoviální kapalinu. Hrozí-li vysušení nebo jsou přítomny škodlivé vlivy prostředí, hyaluronan dokáže chránit nejen zdravé buňky, ale i ty poškozené nebo poraněné a navíc ještě urychluje případné hojení ran. Využití našel také v kosmetice [43].

2.4 Organo-aminojilové komplexy

2.4.1 Obecně

Jak bylo dříve uvedeno, kombinací kladného náboje aminojilových vrstev, nanoskopických mezer a biomolekul nesoucí záporný náboj, je možné úspěšně připravovat organo-jilové komplexy a interkalované nanostruktury s vylepšenými vlastnostmi. V případě takovéto syntézy pak dochází ke vzniku organicko-anorganického hybridního materiálu, u kterého díky inkorporaci vrstev dojde ke změně vlastností, např. ke změně iontové vodivosti, snížení tepelné roztažnosti nebo změně rozpustnosti [4].

Biomolekuly nesoucí záporný náboj (např. DNA, hemoglobin, myoglobin...) jsou schopny v přítomnosti funkčních jilových mezivrstevních prostorů podléhat tzv. samovolnému sestavení. Během tohoto procesu nedochází k poškození primární ani sekundární struktury biomolekuly. Zároveň s tím bylo také pozorováno navýšení biochemické aktivity. Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím samosestavování jsou coulombické interakce mezi záporně nabitými biomolekulami a kladně nabitými aminoskupinami ve struktuře exfoliovaného aminojilu. Aminojil se díky svému pozitivnímu náboji chová jako ideální matrice pro reakce se záporně nabitými molekulami [4].

2.5 Současný stav dané problematiky

Tým A. J. Patila zkoumal možné interakce aminojílu s biopolymery. Pokoušeli se o zabalení molekul oxidovaného myoglobinu a hemoglobinu do hořečnatého fylosilikátu. Úspěšnou interakcí docházelo k tvorbě diskrétních nanočástic.

Kromě aminojílů byly k obalení využity také organicky modifikované jíly, které měly ve své struktuře navázaný dlouhý hydrofobní řetězec. To vedlo k samovolnému seskupení nanočástic a biomolekul do superstruktury, např. kompozitu.

Pomocí TEM a energiově disperzní spektroskopii bylo dokázáno, že všechny vzniklé nanočástice se skládají z jedné biomolekuly obalené ve spojitě vrstvě kondenzovaného oligomeru použitého modifikovaného jílu. Také bylo zjištěno, že při těchto typech interakce nedochází ke změnám v sekundární struktuře biomolekul [45].

Poslední dvě dekády jsou zkoumány možnosti jak získat nejrůznější látky (např. proteiny, lipidy, uhlovodíky) z mořských řas. Bylo zjištěno, že aminojíly v této aplikaci mohou hrát důležitou roli. Mezi jejich vlastnosti patří např. schopnost selektivně rozpouštět struktury mořských červených řas. Nanočástice připravené interakcí aminojílu a huminových látek lze využít právě při těžbě živých mořských řas [46].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

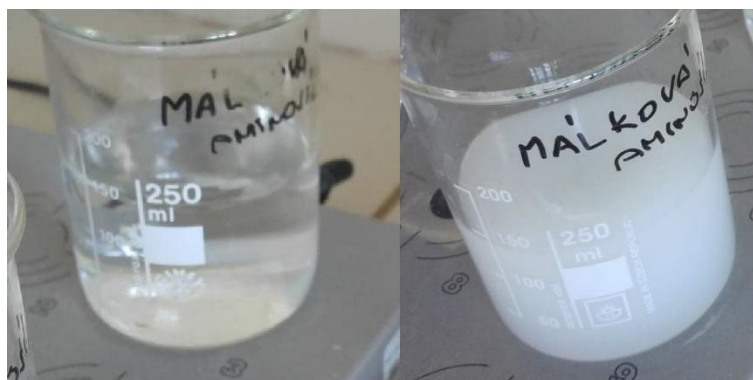
- 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) $[H_2N(CH_2)_3]SiO(Et)_3$
výrobce Sigma Aldrich, CAS: 919-30-2
- hexahydrát chloridu hořečnatého $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
výrobce Lach-Ner, CAS: 7791-18-6
- ethylalkohol absolutní p.a. CH_3CH_2OH
výrobce Penta, CAS: 64-17-5
- ethanol laboratorní CH_3CH_2OH
- pektát draselný
výrobce Sigma Aldrich, CAS: 37251-70-0
- alginát sodný
výrobce Sigma Aldrich, CAS: 9005-38-3
- hyaluronan sodný
č.š.: 200117-3, $\bar{M}_w = 1\,910\, g \cdot mol^{-1}$, vlhkost: 11,72 %
- chlorid vápenatý $CaCl_2$
výrobce Lachema, CAS: 7774-34-7

3.2 Použité přístroje

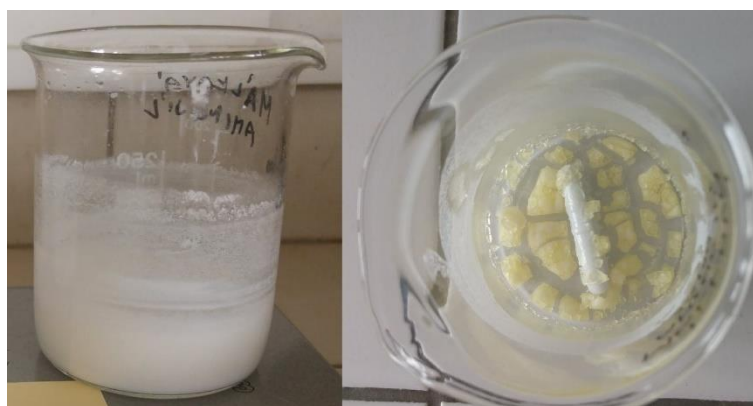
- předvážky DENVER INSTRUMENT S-603
- analytické váhy OHAUS PA214CM
- magnetická míchačka Variomag poly 15
- odstředivka Rotofix 32, Hettich Zentrifugen
- sušárna Venticell, BMT Medical Technology
- pH metr METTLER TOLEDO SevenEasy s vpichovou elektrodou

3.3 Příprava aminojílu

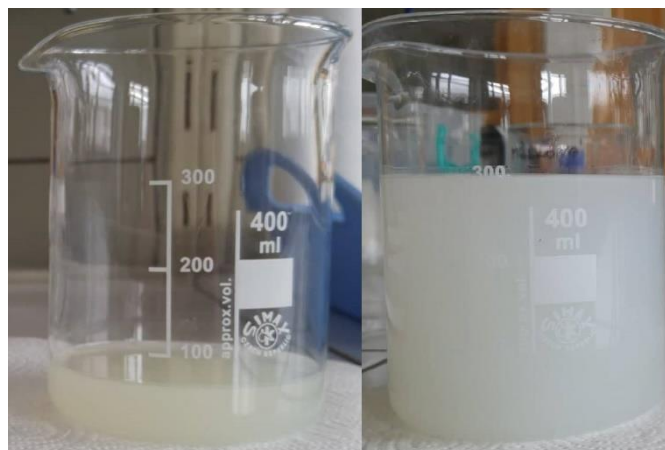
Aminojíl, který byl použit k přípravě vodných vzorků byl připraven přesně podle postupu, který je uveden v teoretické části (viz. 2.2.4 Syntéza aminojílu). Aminojíl byl připraven ve větším množství, než je v kapitole 2.2.4 uvedeno.



Obr. 15 Vlevo rozpuštěný $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ v laboratorním ethanolu, vpravo stejný roztok po přidání APTES



Obr. 16 Vlevo vznik mléčného zbarvení suspenze v důsledku odpařování ethanolu, vpravo vzniklá krystalická hmota aminojílu v důsledku úplného vypaření ethanolu ze suspenze



Obr. 17 Vlevo opětovné rozpuštění krystalické hmoty v deionizované vodě před vložením do ultrazvuku, vpravo suspenze aminojílu po vyjmutí z ultrazvuku a přidavku ethanolu (připraveno k odstředění)



Obr. 18 Vlevo promytý a odstředěný aminojíl připravený k vysušení v sušárně při 50 °C, vpravo suché krystalky aminojílu

3.4 Vybrané látky pro tvorbu organo-aminojílových komplexů

Pro tvorbu komplexů s aminojílem byly vybrány vhodné polyelektrolyty, které po disociaci ve vodném roztoku získaly záporný náboj, který umožní vazbu na exfoliované vrstvy aminojílu. Zvoleny byly polyelektrolyty pektát draselný, alginát sodný a hyaluronan sodný. Všechny tyto polyelektrolyty potřebují ke svému zesíťování kladný náboj, který je dodán exfoliovanými nanočásticemi aminojílu.

3.5 Zásobní roztoky aminojílu a polyelektrolytů

Byly připraveny zásobní vodné roztoky aminojílu o koncentracích $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Dále byly připraveny zásobní vodné roztoky jednotlivých polyelektrolytů v koncentracích $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Nakonec byl připraven také roztok chloridu vápenatého (CaCl_2) o koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Všechny roztoky byly připraveny v deionizované vodě.

3.6 Interakce aminojílu s polyelektrolyty

Byla zkoumána interakce jednotlivých kombinací vodných roztoků aminojílu o různých koncentracích s vodnými roztoky polyelektrolytů, taktéž v několika koncentracích. Koncentrace byly zvoleny tak, aby výsledkem interakce roztoků byl vznik gelu nebo sraženiny.

Každý vzorek byl připraven smícháním 2 mL roztoku aminojílu o koncentraci 5, 10, 15 nebo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a 2 mL roztoku polyelektrolytu (pektát, alginát, hyaluronan) o koncentraci 10, 15

nebo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. V případě vzorků obsahujících roztoky alginátů byl do každého vzorku navíc přidán ještě 1 mL roztoku chloridu vápenatého o koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, aby došlo k zasíťování. Takto bylo celkem připraveno 36 vzorků.

3.7 Charakterizace gelů a sraženin

Připravené vzorky byly zkoumány okometricky. Konkrétně bylo pozorováno zbarvení vzniklého gelu nebo sraženiny, zda došlo k lokálnímu zgelovatění/vzniku sraženiny nebo zda došlo k vytvoření gelu v celém objemu vzorku. Dále bylo pozorováno, zda ke vzniku gelu/sraženiny došlo okamžitě po smíchání zvoleného objemu roztoků nebo došlo ke zgelovatění až s časovou prodlevou. Všechny připravené vzorky byly fotograficky zaznamenány.

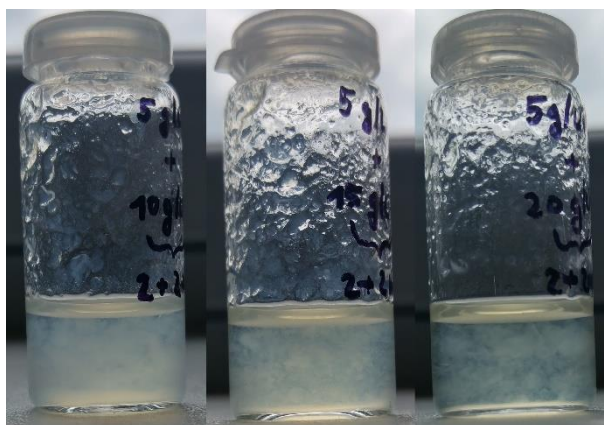
Následně bylo měřeno pH vzniklých gelů a sraženin na pH metru METTLER TOLEDO SevenEasy pomocí laboratorní vpichové elektrody. Měření probíhalo při teplotě 25°C .

4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

4.1 Interakce aminojílu s pektátem

4.1.1 Koncentrace aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Smícháním roztoku aminojílu s roztoku pektátu ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) došlo ke vzniku velmi malého množství pevného nažloutlého homogenního gelu na dně vialky (Obr. 19). Ve zbytkovém roztoku vznikl velmi měkký nekompaktní téměř bezbarvý gel a zůstal nezreagovaný poměrně velký objem roztoku. U vzorku aminojílu a pektátu ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) byl výsledný roztok velice podobný tomu předchozímu. Vzniklo malé množství pevného nažloutlého gelu na dně vialky a ve zbytkovém roztoku, ve kterém také vzrostla viskozita a vzniklo malé množství nekomplaktního gelu. Ve vzorku obsahující aminojíl a pektát ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) nebyl na dně usazen žádný gel, ale byly vidět malé nažloutlé vláknité sraženiny nekomplaktního gelu. Viskozita roztoku se lehce zvýšila.

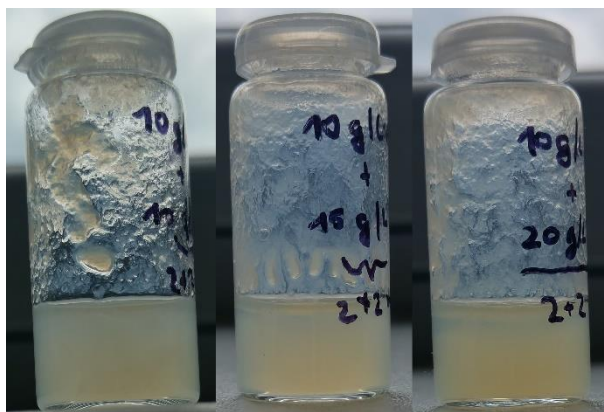


Obr. 19 Vzorky s koncentrací aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace pektátu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Důvodem proč nevznikly pevné gely, bude s největší pravděpodobností nedostatečná koncentrace aminojílu ve výsledném roztoku.

4.1.2 Koncentrace aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

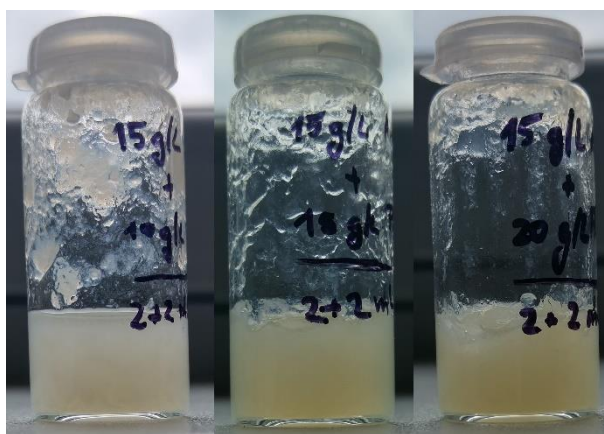
U vzorku s koncentrací polyelektrolytu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ vzniklo malé množství nažloutlého měkkého gelu, který po protřepání zůstal přichycený na stěně vialky (Obr. 20). Nepatrná část gelu zůstala v roztoku, který měl zvýšenou viskozitu a byl homogenní. U vzorku o koncentraci pektátu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ došlo ke vzniku pevného nažloutlého gelu v celém objemu roztoku. Stejná situace nastala také u vzorku s koncentrací pektátu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Došlo ke vzniku homogenního nažloutlého gelu, který zaujímal celý objem původního roztoku. Gelace proběhla okamžitě po protřepání.



Obr. 20 Vzorok s koncentrací aminojílu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace pektátu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

4.1.3 Koncentrace aminojílu $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

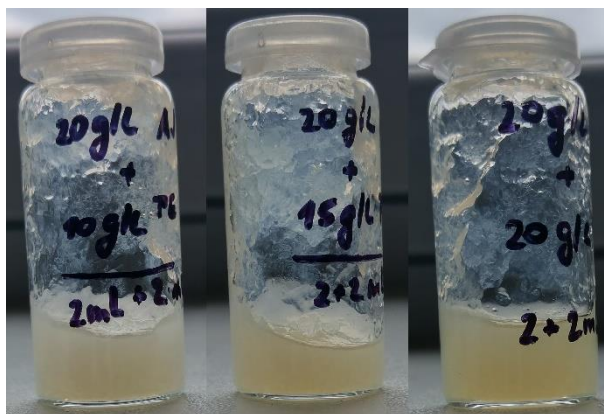
U roztoku o koncentraci $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ pektátu došlo opět ke vniku pouze měkkého nekompaktního gelu, který po zatřepání zůstal přilepený na stěně vialky (Obr. 21). U výsledného roztoku narostla viskozita a byly v něm vidět jemné fragmenty gelu, který nezůstal uchycený na stěně. U zbylých dvou roztoků této řady (tj. $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) došlo k vytvoření nažloutlých homogenních gelů v celém objemu. V těchto případech navíc byly dobře vidět vlákna síťování.



Obr. 21 Vzorok s koncentrací aminojílu $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace pektátu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

4.1.4 Koncentrace aminojílu $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

V případě této řady, proběhla úplná gelace do celého objemu u všech tří vzorků. Stalo se tak okamžitě po protřepání a vznikly nažloutlé pevné homogenní gely (Obr. 22).



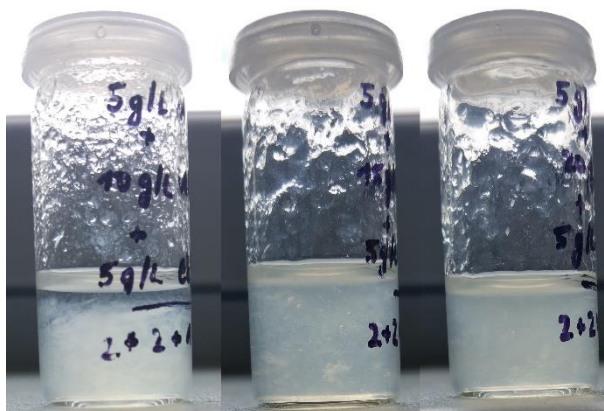
Obr. 22 Vzorky s koncentrací aminojílu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace pektátu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.2 Interakce aminojílu s alginátem

Aby bylo docíleno síťování gelů, byl do všech vzorků obsahujících alginát přidán 1 mL roztoku chloridu vápenatého o koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.2.1 Koncentrace aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

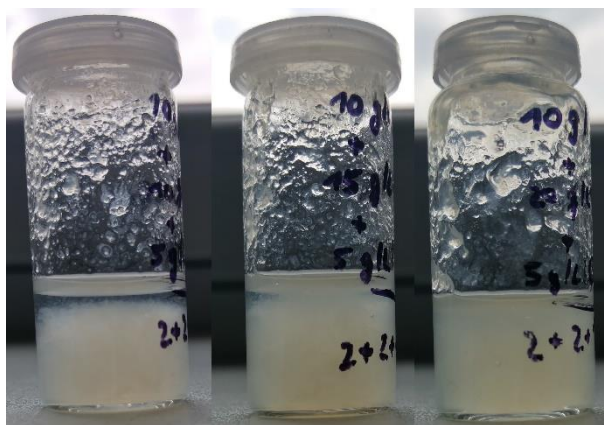
U nejnižší koncentrace alginátu ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) došlo ke vzniku hodně malých sraženin gelu bílé barvy. Připravený roztok se lehce zakalil a nedošlo k viditelné změně viskozity. Při protřepání vzorku část sraženin zůstala přichycená na stěně vialky (Obr. 23). U vyšší koncentrace alginátu ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) došlo také vzniku malých doběla zbarvených sraženin. Opět došlo k zakalení roztoku a pozorovatelně se zvýšila jeho viskozita. U nejvyšší koncentrace vznikly bílé sraženiny, roztok se zdál být zakalenější než ty předchozí a viskozita byla větší než u předešlého.



Obr. 23 Vzorky s koncentrací aminojílu $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace alginátu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.2.2 Koncentrace aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

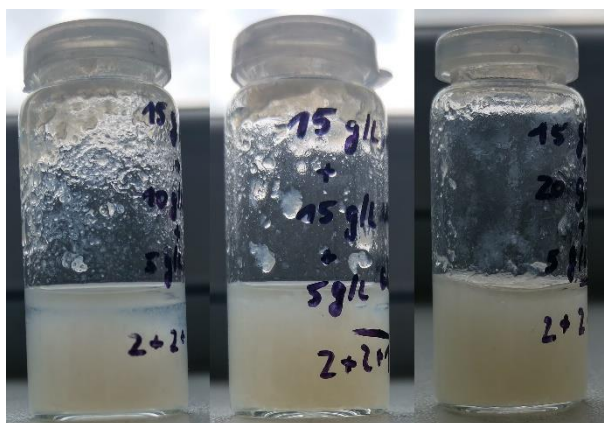
U vzorku obsahující alginát o koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ došlo k vytvoření velkého množství malých bílých sraženin, u kterých docházelo velmi pomalu k sedimentaci (Obr. 24). Způsobeno to bylo pravděpodobně nízkou viskozitou roztoku. Při koncentraci $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ vznikli větší sraženiny a narostla viskozita a u koncentrace $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ byly tyto jevy ještě snadněji pozorovatelné (vysoká viskozita a velké množství sraženin).



Obr. 24 Vzorky s koncentrací aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace alginátu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.2.3 Koncentrace aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

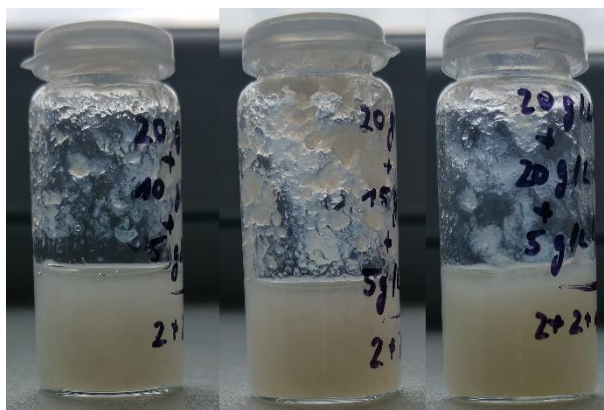
Už při nejnižší koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ se utvořily velké sraženiny bílé barvy, které byly snadno rozeznatelné od čirého roztoku (Obr. 25). U této i následující koncentrace ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) zaujímaly sraženiny gelu skoro celý objem roztoku. U poslední koncentrace ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) vznikly pevný homogenní gel v celém objemu a objem zbytkového roztoku byl téměř nulový.



Obr. 25 Vzorky s koncentrací aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace alginátu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.2.4 Koncentrace aminojílu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Koncentrace $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ – Vzniklo velké množství sraženin a nedošlo ke vzniku homogenního gelu v celém objemu (Obr. 26). Vzorek svou viskozitou připomínal kašovitou hmotu. U vyšší koncentrace ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) opět vznikly bílé sraženiny gelu v celém objemu. Pevný homogenní gel v celém objemu vzorku vznikl u nejvyšší koncentrace ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). K procesu gelace došlo okamžitě po protřepání.



Obr. 26 Vzorky s koncentrací aminojílu $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace alginátu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

4.3 Interakce aminojílu s hyaluronanem

4.3.1 Koncentrace aminojílu $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

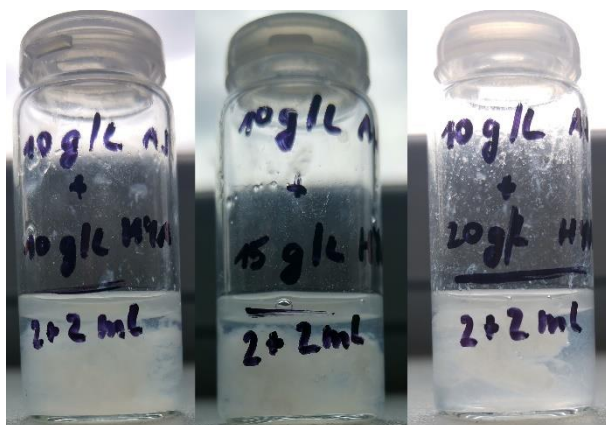
U všech 3 vzorků této řady došlo ke vzniku bílých vláknitých sraženin. S rostoucí koncentrací rostla i velikost výsledné sraženiny. Společně s rostoucí koncentrací rostla také viskozita okolního roztoku z důvodu přítomnosti velkého množství hyaluronanu, který nebyl navázán do komplexu s aminojílem.



Obr. 27 Vzorky s koncentrací aminojílu $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace hyaluronanu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

4.3.2 Koncentrace aminojílu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

I u této koncentrační řady vznikly ve všech vzorcích bílé vláknité sraženiny. Prostorově zabíraly skoro celý objem vzorku a jejich vláknitá struktura byla dobře pozorovatelná. Komplex aminojíl-hyaluronan ovlivnil zbylý roztok a u něho došlo také k částečnému vytvoření gelu. Vznikly tedy bílé sraženiny obalené hyaluronanovým gelem.



Obr. 28 Vzorky s koncentrací aminojílu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace hyaluronanu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.3.3 Koncentrace aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

U všech tří koncentrací vznikla velká bílá vláknitá sraženina, u prvních dvou téměř v celém objemu vzorku, u $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ vznikla sraženina v celém objemu vzorku.



Obr. 29 Vzorky s koncentrací aminojílu $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace hyaluronanu $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.3.4 Koncentrace aminojílu $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

V nejnižší koncentraci této řady vznikla bílá vláknitá sraženina o objemu zhruba poloviny vzorku. Sraženina byla poměrně pevná a lehce se s ní dalo ve vialce manipulovat. Zbytek vzorku tvořil čirý, bezbarvý, lehce viskózní roztok. U koncentrace $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ vznikla bílá vláknitá sraženina v celém objemu a nezbyl žádný roztok. Stejně tak se stalo i u poslední, nejvyšší koncentrace ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).



Obr. 30 Vzorčky s koncentrací aminojílu $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; vlevo koncentrace hyaluronanu $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, uprostřed $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, vpravo $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Okometricky bylo vypořováváno, že komplexy aminojíl-pektin a aminojíl-alginát mají tendenci tvořit spíše gely v celém objemu. Na druhou stranu komplex aminojíl-hyaluronan tvoří lokální gely, nebo spíše sraženiny. Aby došlo k procesu gelace je nutné dosáhnout dostatečné koncentrace obou komponent, v případě komplexů s alginátem všech tří (musí být dostatečná koncentrace CaCl_2), aby byl umožněn vznik vazeb mezi molekulami. Lze vyvodit, že s rostoucími koncentracemi jednotlivých komponent nabývá vzniklý gel/sraženina na objemu, stejně tak jako na homogennosti.

U komplexů aminojíl-alginát a aminojíl-pektát se koncentrace složek potřebných pro vznik celobjemového gelu pohybovala u aminojílu kolem $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a u polyelektrolytu také kolem $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. U komplexu aminojíl-hyaluronan vznikla sraženina už při nejnižší použité koncentraci (aminojíl $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a polyelektrolyt $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Díky svému zápornému náboji ve vodných roztocích se prokázaly všechny tři polyelektrolyty jako vhodné reaktanty pro interakce s kladně nabitým aminojílem. Vznik komplexů ve formě gelů byl velmi dobře pozorovatelný.

4.4 Měření pH

U všech připravených vzorků byla změřena hodnota pH. Naměřené hodnoty jsou vyneseny do tabulek (Tab. 2, 3, 4) a grafů (Graf 1, 2, 3).

Tab. 2 Naměřené hodnoty pH připravených vzorků aminojílu s pektátem

		AMINOJÍL			
		5 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	15 g·L ⁻¹	20 g·L ⁻¹
PEKTÁT	10 g·L ⁻¹	9,69	9,54	9,41	9,40
	15 g·L ⁻¹	9,58	9,56	9,47	9,54
	20 g·L ⁻¹	9,01	9,58	9,48	9,49

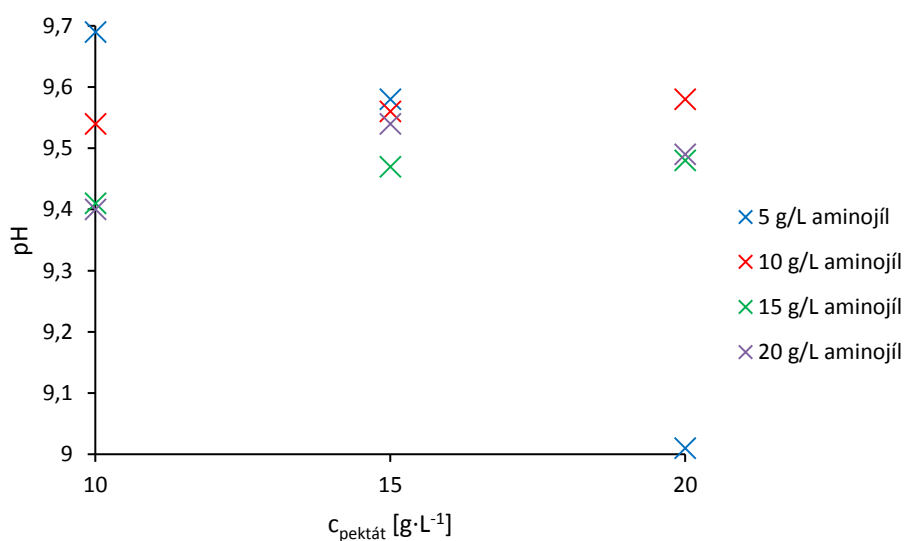
Tab. 3 Naměřené hodnoty pH připravených vzorků aminojílu s alginátem

		AMINOJÍL			
		5 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	15 g·L ⁻¹	20 g·L ⁻¹
ALGINÁT	10 g·L ⁻¹	9,83	9,74	9,70	9,61
	15 g·L ⁻¹	9,95	9,84	9,74	9,64
	20 g·L ⁻¹	10,01	9,88	9,82	9,75

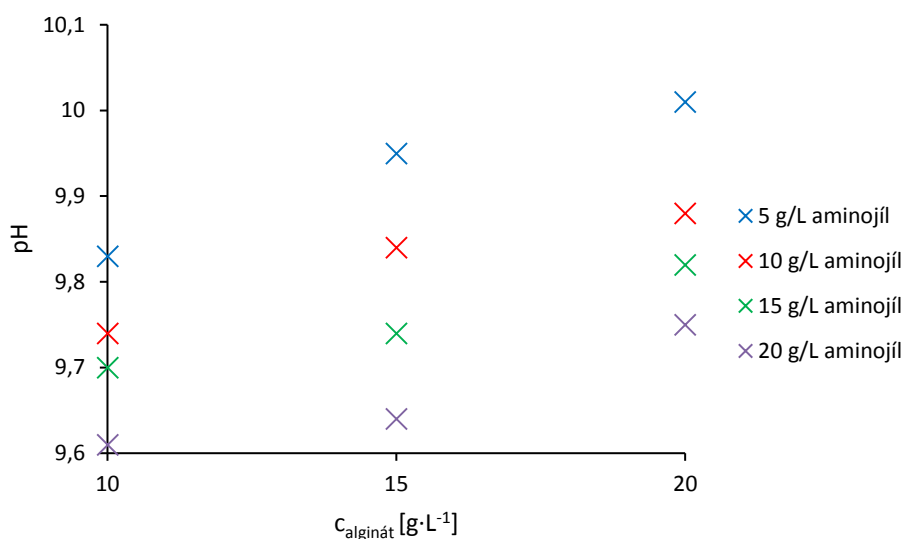
Tab. 4 Naměřené hodnoty pH připravených vzorků aminojílu s hyaluronanem

		AMINOJÍL			
		5 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	15 g·L ⁻¹	20 g·L ⁻¹
HYA	10 g·L ⁻¹	10,19	9,84	9,67	9,63
	15 g·L ⁻¹	10,17	9,88	9,69	9,66
	20 g·L ⁻¹	10,11	9,92	9,74	9,68

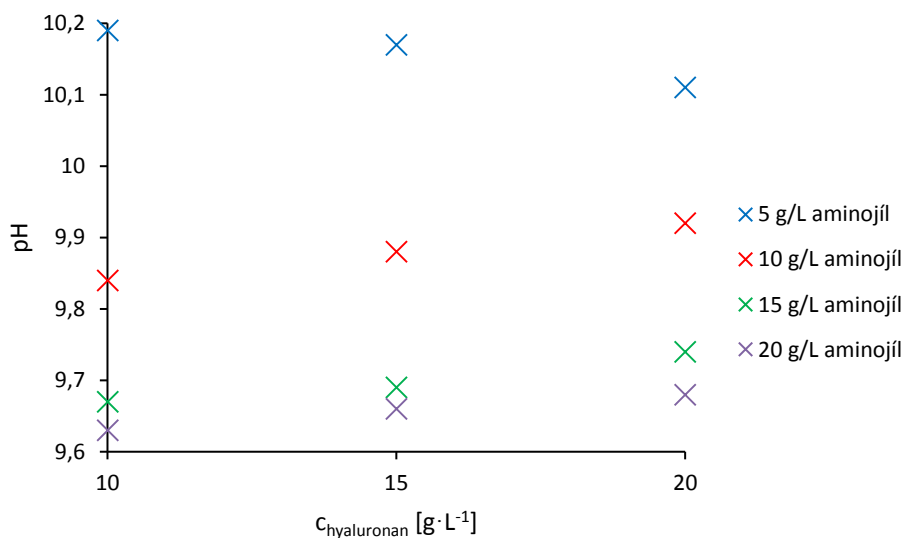
Graf 1 Naměřené hodnoty pH v závislosti na koncentraci pektátu a koncentraci aminojílu



Graf 2 Naměřené hodnoty pH v závislosti na koncentraci alginátu a koncentraci aminojílu



Graf 3 Naměřené hodnoty pH v závislosti na koncentraci hyaluronanu a koncentraci aminojílu



Z naměřených hodnot pH vynesných do jednotlivých grafů lze vyčíst, že se pH vzniklých komplexů aminojílu a polyelektrolytu pohybuje v rozmezí hodnot 9 – 10 při koncentracích aminojílu 5, 10, 15 a 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ a koncentracích polyelektrolytu 10, 15 a 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Také si lze povšimnout, že hodnoty pH klesají s narůstající koncentrací aminojílu a zároveň klesající koncentrací polyelektrolytu. U komplexů aminojíl-hyaluronan měl nejnižší hodnotu pH vzorek o koncentraci 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ aminojíl a 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ hyaluronan. Pokud by tyto komplexy měly být využity v biomedicině, pro lidský organismus by byl nejpříjemnější komplex s hodnotou pH blízkou se co nejvíce neutrálním hodnotám ($\text{p} \cdot \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) – pektát (20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), u kterého bylo naměřeno pH 9,01.

5 ZÁVĚR

Podle postupu popsaného v kapitole 2.2.4 byl připraven hořčnatý aminojíl a následně byly připraveny komplexy aminojílu s pektátem draselným, alginátem sodným a hyaluronanem sodným.

Připravené vodné roztoky aminojílu a vybraných látek byly míseny a byl pozorován výsledek. Díky vhodně zvoleným koncentracím došlo ke vzniku sraženin nebo gelů ve vzorcích. Vzniklé struktury byly okometricky charakterizovány (zbarvení, velikost aj.)

Vznik gelů a sraženin dokázal, že vybrané biomolekuly podléhají ve vodném roztoku disociaci, získávají záporný náboj a jsou schopny interakce s kladně nabitými exfoliovanými nanočásticemi hořčnatého aminojílu za vzniku komplexů. Z pozorování bylo vyvozeno, že se zvyšující se koncentrací jednotlivých komponent dochází ke vzniku gelu ve větším objemu a také je dosaženo jeho větší homogennosti a mechanické pevnosti. Bylo zjištěno, že komplexy tvořené hyaluronanem a aminojílem tvoří bílé sraženiny. Naopak komplexy s pektátem a alginátem mají tendenci tvořit gely v celém objemu vzorku. Pokud je koncentrace dostatečná, dochází k vytvoření velice pevných gelů. Z výsledků lze usoudit, že pro tvorbu komplexu aminojíl-polyelektrolyt byly vhodné všechny tři použité polyelektrolyty.

Z naměřených hodnot pH vpichovou elektrodou bylo zjištěno, že všechny komplexy jsou alkalické a s rostoucí koncentrací polyelektrolytu bazicita roste. Naopak s rostoucí koncentrací aminojílu bazicita klesá. Nejnížší pH měly tedy vzorky složené z roztoku polyelektrolytu o nízké koncentraci a roztoku aminojílu o vysoké koncentraci.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

6.1 Zkratky

DNA	deoxyribonukleová kyselina
Hb	hemoglobin
Mb	myoglobin
GOx	plynný kyslík
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
HGA	homogalakturonan
RG-I	rhamnogalakturonan I
RG-II	rhamnogalakturonan II
DE	stupeň esterifikace
G	L-guluronát
M	D-mannuronát
HYA	hyaluronan sodný

6.2 Symboly

Å	Ångström
Da	Dalton
c	koncentrace

7 SEZNAM LITERATURY

- [1] VALÁŠKOVÁ, Marta. *Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-811-3.
- [2] Kyselina hyaluronová. In: *CONTIPRO GROUP* [online]. 2011 [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: <http://www.contipro.cz/o-contipru/kyselina-hyaluronova>
- [3] Polyelektrolyt. In: BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Co je co v povrchové a koloidní chemii: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT, 2005 [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/polyelektrolyt.html
- [4] DATTA, K. K. R., A. ACHARI a M. ESWARAMOORTHY. Aminoclay: a functional layered material with multifaceted applications. *Journal of Materials Chemistry A* [online]. 2013, 1(23) [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1039/c3ta00100h. ISSN 2050-7488. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ta00100h>
- [5] BUI, Vu Khac Hoang, Duckshin PARK a Young-Chul LEE. Aminoclays for biological and environmental applications: An updated review. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2018, 336, 757-772 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.cej.2017.12.052. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894717321733>
- [6] WEISS, Zdeněk a Miloš KUŽVART. *Jilové minerály: jejich nanostruktura a využití*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0868-5.
- [7] CHVÁTAL, Marek. Úvod do systematické mineralogie. Praha: Silikátový svaz, 2005. ISBN 80-86821-11-0.
- [8] LAPČÍK, Lubomír a Miroslav RAAB. *Nauka o materiálech II*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-238-6527-7.
- [9] VÁVRA, Václav a Zdeněk LOSOS. Multimediální studijní texty z mineralogie pro bakalářské studium [online]. In: . Ústav geologických věd, Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita, Brno [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: <http://mineralogie.sci.muni.cz>
- [10] The Dynamics of Potassium in some Australian soils - Scientific Figure on ResearchGate. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-11-and-21-clay-minerals-Sivakugan-2001_fig5_306255491 [cit. 2019-05-21]
- [11] DE PAIVA, Lucilene Betega, Ana Rita MORALES a Francisco R. VALENZUELA DÍAZ. Organoclays: Properties, preparation and applications. *Applied Clay Science* [online]. 2008, 42(1-2), 8-24 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.clay.2008.02.006. ISSN 01691317. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169131708000495>
- [12] MIAO, Shiding, Zhimin LIU, Buxing HAN, Jun HUANG, Zhenyu SUN, Jianling ZHANG a Tao JIANG. Ru Nanoparticles Immobilized on Montmorillonite by Ionic Liquids: A Highly Efficient Heterogeneous Catalyst for the Hydrogenation of Benzene. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2006, 45(2), 266-269 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1002/anie.200502632. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200502632>

- [13] HSU, Ru-Siou, Wen-Hsin CHANG a Jiang-Jen LIN. Nanohybrids of Magnetic Iron-Oxide Particles in Hydrophobic Organoclays for Oil Recovery. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2010, **2**(5), 1349-1354 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1021/am100019t. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/am100019t>
- [14] PRIOLO, Morgan A., Daniel GAMBOA, Kevin M. HOLDER a Jaime C. GRUNLAN. Super Gas Barrier of Transparent Polymer–Clay Multilayer Ultrathin Films. *Nano Letters* [online]. 2010, **10**(12), 4970-4974 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1021/nl103047k. ISSN 1530-6984. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl103047k>
- [15] VISERAS, C., P. CEREZO, R. SANCHEZ, I. SALCEDO a C. AGUZZI. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science* [online]. 2010, **48**(3), 291-295 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.clay.2010.01.007. ISSN 01691317. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169131710000219>
- [16] PLACHÁ, Daniela, Grażyna SIMHA MARTYŃKOVÁ a Jana KUKUTSCHOVÁ. Sorpce par naftalenu na organicky modifikovaný vermikulit. *Chemické listy* [online]. 2011, **105**(3), 186-192 [cit. 2019-05-21]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10084/84502>
- [17] POSPÍŠIL, M a spol. Strukturní analýza interkalovaných silikátů s využitím modelování a práškové difrakce [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: https://www.xray.cz/xray/csc/kol2002/doc/miroslav_pospisil.htm
- [18] GHADIRI, M., W. CHRZANOWSKI a R. ROHANIZADEH. Biomedical applications of cationic clay minerals. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(37), 29467-29481 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1039/C4RA16945J. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA16945J>
- [19] UTRACKI, L.A. Clay-containing polymeric nanocomposites. Shrewsbury: Rapra Technology, 2004. ISBN 1859574858.
- [20] ALEXANDRE, Michael a Philippe DUBOIS. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2000, **28**(1-2), 1-63 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/S0927-796X(00)00012-7. ISSN 0927796X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X00000127>
- [21] HNILIČKA, Jakub. *Studium možnosti hodnocení interkalace/exfoliace systému polymer/jíl*. Zlín, 2006. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Dagmar Měřinská Ph.D.
- [22] DA FONSECA, Maria G. Self-Organized Inorganic-Organic Hybrids Induced by Silylating Agents with Phyllosilicate-Like Structure and the Influence of the Adsorption of Cations. *Clays and Clay Minerals* [online]. 2000, **48**(6), 638-647 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1346/CCMN.2000.0480605. ISSN 0009-8604. Dostupné z: <http://www.clays.org/journal/archive/volume%2048/48-6-638.pdf>

- [23] ANJUGAM VANDARKUZHALI, S. ANBU, N. RADHA a KANNAIYAN PANDIAN. Water Soluble Iron aminoclay for Catalytic Reduction of Nitrophenol. *Oriental Journal Of Chemistry* [online]. 2013, **29**(2), 661-665 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.13005/ojc/290238. ISSN 0970-020X. Dostupné z: <http://www.orientjchem.org/absdoic.php?snoid=290238>
- [24] AHMADI, S. J., Y. D. HUANG a W. LI. Synthetic routes, properties and future applications of polymer-layered silicate nanocomposites. *Journal of Materials Science* [online]. 2004, **39**(6), 1919-1925 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1023/B:JMSC.0000017753.90222.96. ISSN 0022-2461. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:JMSC.0000017753.90222.96>
- [25] UKRAINCZYK, L., R. A. BELLMAN a A. B. ANDERSON. Template Synthesis and Characterization of Layered Al- and Mg-Silsesquioxanes. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 1997, **101**(4), 531-539 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1021/jp962937l. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp962937l>
- [26] LEE, Young-Chul, EonSeon JIN, Seung Won JUNG, et al. Utilizing the algicidal activity of aminoclay as a practical treatment for toxic red tides. *Scientific Reports* [online]. 2013, **3**(1) [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1038/srep01292. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep01292>
- [27] CHANDRASEKARAN, Gayathri, Hyo-Kyung HAN, Geun-Joong KIM a Hyun-Jae SHIN. Antimicrobial activity of delaminated aminopropyl functionalized magnesium phyllosilicates. *Applied Clay Science* [online]. 2011, **53**(4), 729-736 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.clay.2011.07.001. ISSN 01691317. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169131711002407>
- [28] HAN, Hyo-Kyung, Young-Chul LEE, Moo-Yeol LEE, Avinash J. PATIL a Hyun-Jae SHIN. Magnesium and Calcium Organophyllosilicates: Synthesis and In vitro Cytotoxicity Study. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2011, **3**(7), 2564-2572 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1021/am200406k. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/am200406k>
- [29] YANG, Liang, Young-Chul LEE, Moon Il KIM, Hyun Gyu PARK, Yun Suk HUH, Yating SHAO a Hyo-Kyung HAN. Biodistribution and clearance of aminoclay nanoparticles: implication for in vivo applicability as a tailor-made drug delivery carrier. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2014, **2**(43), 7567-7574 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1039/C4TB00953C. ISSN 2050-750X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TB00953C>
- [30] DAUTZENBERG, H. *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*. Cincinnati: Hanser/Gardner, c1994. ISBN 1-56990-127-9.
- [31] MUNARIN, F., M.C. TANZI a P. PETRINI. Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2012, **51**(4), 681-689 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813012002759>

- [32] ŁĘKAWSKA-ANDRINOPOULOU, Lucyna, Efstathios G. VASILIOU, Dimitrios G. GEORGAKOPOULOS, Constantinos P. YIALOURIS a Constantinos A. GEORGIOU. Rapid Enzymatic Method for Pectin Methyl Esters Determination. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2013, **2013**, 1-7 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1155/2013/854763. ISSN 2090-8865. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jamc/2013/854763/>
- [33] MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2008, **11**(3), 266-277 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.pbi.2008.03.006. ISSN 13695266. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526608000630>
- [34] DEVRIES, J, C DENUIJL, A VORAGEN, F ROMBOUTS a W PILNIK. Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1983, **3**(3), 193-205 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/0144-8617(83)90018-8. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0144861783900188>
- [35] LEE, Kuen Yong a David J. MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, **37**(1), 106-126 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000918>
- [36] OTTERLEI, Marit, Kjetill ØSTGAARD, Gudmund SKJÅK-BRÆK, Olav SMIDSRØD, Patrick SOON-SHIONG a Terje ESPEVIK. Induction of Cytokine Production from Human Monocytes Stimulated with Alginate. *Journal of Immunotherapy*. 1991, **10**(4), 286-291.
- [37] ZIMMERMANN, Ulrich, Gerd KLÖCK, Konrad FEDERLIN, et al. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 1992, **13**(1), 269-274 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1002/elps.1150130156. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150130156>
- [38] ORIVE, G, S PONCE, R.M HERNÁNDEZ, A.R GASCÓN, MIGARTUA a J.L PEDRAZ. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(18), 3825-3831 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00118-7. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961202001187>
- [39] LEE, Jangwook a Kuen Yong LEE. Local and Sustained Vascular Endothelial Growth Factor Delivery for Angiogenesis Using an Injectable System. *Pharmaceutical Research* [online]. 2009, **26**(7), 1739-1744 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1007/s11095-009-9884-4. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-009-9884-4>
- [40] SAKIYAMA-ELBERT, SE a JA HUBBELL. Functional Biomaterials: Design of Novel Biomaterials. *Annual Review of Materials Research* [online]. 2001, **31**(1), 183-201 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1146/annurev.matsci.31.1.183. ISSN 1531-7331. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.matsci.31.1.183>

- [41] HASCALL, Vincent a Torvard LAURENT. Hyaluronan Structure and Physical Properties. In: Glycoforum [online]. 1997 [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [42] SCOTT, John E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. In: Glycoforum [online]. 1998 [cit. 2019-05-21]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [43] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **29**(1), 17-25 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [44] PROCHÁZKOVÁ, Anna. *Interakce aminojílů s polyelektrolyty přírodního původu*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [45] PATIL, Avinash J., Eswaramoorthy MUTHUSAMY a Stephen MANN. Synthesis and Self-Assembly of Organoclay-Wrapped Biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2004, **43**(37), 4928-4933 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1002/anie.200453868. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200453868>
- [46] LEE, Young-Chul, Seo Yeong OH, Hyun Uk LEE, et al. Aminoclay-induced humic acid flocculation for efficient harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **153**, 365-369 [cit. 2019-05-21]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.103. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413018658>